



BIOACESSIBILIDADE DE ÁCIDOS GORDOS EM SALMÃO E CORVINA DE AQUACULTURA.

Nádia Raquel Encarnação Chaveiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos

Orientador: Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

Co-orientador: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Júri:

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

VOGAIS Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra, Investigadora Auxiliar do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

Lisboa, 2012

**O trabalho apresentado nesta tese foi realizado nos laboratórios de Investigação das
Pescas e do Mar, do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB, Instituto
Português do Mar e da Atmosfera, I.P./ IPMA)**

Agradecimentos

Agradeço desde já, a todos aqueles que durante a realização desta dissertação, para obtenção de grau de Mestre, me apoiaram e ajudaram tornando o tempo nela despendido satisfatório e valioso quer a nível académico, quer a nível pessoal.

Agradeço ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P./ IPMA pela oportunidade concedida e por me ter permitido um contato mais direto com o mundo da investigação.

À Dr.^a. Narcisa Maria Mestre Bandarra, investigadora auxiliar do IPMA/ Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP (INRB-IP), que tão gentilmente me recebeu e teve a preocupação de desenvolver o trabalho com tempo e qualidade. Obrigada pela confiança, incentivo e paciência.

À Professora Dr.^a. Luísa Louro Martins agradeço, não só por todo o acompanhamento ao longo do meu percurso académico, assim como o apoio e carinho durante toda esta etapa.

À Sara Costa, Bolseira de Investigação no INRB-IPMA, que desde o primeiro dia me recebeu amavelmente e me integrou, acompanhando-me sempre e orientando-me o melhor possível, tanto na parte prática, como na parte escrita desta tese. Obrigado por tudo, pela paciência, pela compreensão, pela ajuda e, principalmente, pela amizade.

Agradeço, também, à Bárbara Teixeira e à Patrícia Oliveira, Bolseiras de Investigação no INRB-IPMA, pela simpatia e boa disposição, que facilitou a minha integração e tornou os dias mais divertidos

Aos Amigos Tânia Mendes, Vera Cunha, Patrícia Pato, André Marques, Ana Patrícia e Alexandre Bernardo por me terem acompanhado e apoiado em todo o meu percurso escolar e/ou pessoal, por me terem ouvido nos momentos difíceis, por partilharem comigo as minhas alegrias, por me aconselharem e, acima de tudo, pela amizade verdadeira. São poucos mas bons.

Agradeço aos meus pais pelo investimento na minha formação académica. Obrigado por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Amo-vos muito e dedico-vos este trabalho, assim como ao meu irmão que mesmo longe sempre me colocou um sorriso no rosto e me fez levar as coisas com outro ânimo. És e sempre serás o meu menino.

Ao meu namorado, agradeço por toda a paciência, carinho, compreensão e força que me deu, especialmente nos momentos mais difíceis, e por acreditar em mim, mesmo quando nem eu acreditava. Pelo teu amor e todo o teu apoio que foi sempre muito importante, obrigado.

Glossário de Abreviaturas

As abreviaturas utilizadas ao longo do texto são aqui apresentadas, por ordem alfabética, seguidas da correspondente definição. No texto são explicadas na primeira vez que aparecem, mantendo-se as abreviaturas na forma em que são reconhecidas internacionalmente, sendo incluída a tradução mais próxima conhecida.

AA – Ácido araquidónico.

ALA – Ácido alfa-linoleico.

CL – Colesterol.

DAG – Diacilgliceróis.

DHA – Ácido 4,7,10,13,16,19- Docosahexenóico, 22:6n-3.

DPA – Ácido docosapentenóico, 22:5n-3.

ECL – Comprimento equivalente da cadeia (Equivalent chain length).

EFA – Ácidos Gordos Essenciais.

EPA – Ácido 5,8,11,14,17- Eicosapentenóico, 20:5n-3.

FA – Ácidos Gordos.

FAME – Ésteres Metílicos dos Ácidos Gordos.

FAO – Food and Agriculture Organization.

FFA – Ácido Gordo Livre.

GC-FID – Cromatografia Gás-Líquido com detetor de Ionização de Chama.

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

INRB – Instituto Nacional de Recursos Biológicos.

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

LA – Ácido Linoleico, 18:2n-6.

LC – Cadeia Longa.

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade.

LT – Lípidos totais.

MAG – Monoacilgliceróis.

MUFA – Ácidos Gordos Monoinsaturados.

NP – Norma Portuguesa.

PL - Fosfolípidos.

PLA – Lipase pancreática.

PUFA n-3 – Ácidos Gordos Polinsaturados da Família Ómega-3.

PUFA n-6 – Ácidos Gordos Polinsaturados da Família Ómega-6.

SFA – Ácidos Gordos Saturados.

STD – Ácido estearidónico, 18:4n-3.

TAG – Triacilglicerol.

TC – Condutividade térmica.

TLC – Cromatografia de camada fina (Thin layer Chromatography).

UVPPA – Unidade de investigação de valorização dos produtos da pesca e de aquicultura.

VLDL – Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa.

UV – Ultra Violeta.

Resumo

Este trabalho averigua a influência de um tratamento culinário drástico na composição química, em especial, no perfil lipídico de duas espécies de peixe de aquacultura, o salmão e a corvina, e quantifica a percentagem de bioacessibilidade de cada ácido gordo nessas duas espécies em cada tratamento culinário. Para tal, são utilizadas metodologias de extração de lípidos totais (LT), baseadas nas técnicas de Bligh & Dyer (1959), de cromatografia de camada fina e de transesterificação de ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME – Fatty acid Methyl Esters).

É verificado que o tratamento culinário promove a perda de humidade do alimento e a, conseqüente, concentração dos ácidos gordos, embora este efeito não seja homogêneo para todos os ácidos gordos, nem para as duas espécies em causa.

Quanto à bioacessibilidade, verifica-se que no salmão os ácidos gordos mais bioacessíveis são os polinsaturados, com uma percentagem de 67,40% no cru e 60,72% no grelhado e, dentro destes, o ácido docosahexenóico é o mais bioacessível, com uma percentagem de 92,30% no salmão cru e 60,22% no salmão grelhado.

Na corvina, os ácidos gordos mais bioacessíveis são os saturados, com 86,51% no cru e 56,28% no grelhado, revelando assim que o consumo de salmão é mais saudável.

Palavras-Chave: bioacessibilidade, ácidos gordos polinsaturados, salmão, corvina, aquacultura, cromatografia de camada fina.

Abstract

This work investigates the effect of a drastic cooking treatment in chemical composition, particularly, on lipid profile of two species of farmed fish, salmon and meagre, and quantifies the percentage of each fatty acid bioaccessibility on these two species in each culinary treatment. To this end, are used methodologies for extracting total lipids (TL), based on the techniques of Bligh & Dyer (1959), for thin layer chromatography and the transesterification of fatty acid methyl esters (FAME - Fatty Acid Methyl Esters).

It is verified that the culinary treatment promotes the moisture loss and, consequent, concentration of the fatty acids from the food, although this effect is not uniform for all fatty acids or to both species concerned.

Regarding the bioaccessibility it turns out that the fatty acids more bioaccessible on the salmon, are the polyunsaturated fatty acids with a percentage of 67.40% to 60.72% in raw and grilled and within these, docosahexanoic acid is the most bioaccessible with a percentage of 92.30% in raw salmon and 60.22% on grilled salmon.

In the meagre, the fatty acids more bioaccessible are the saturated, with 86.51% in raw and 56.28% in raw and grilled, thus revealing the consumption of salmon is more healthier.

Keywords: Bioaccessibility, polyunsaturated fatty acids, salmon, meagre, aquaculture, thin layer chromatography.

Extended Abstract

Fish is an important source of nutrients, with a high protein, vitaminic and mineral content, as well as, an interesting lipid composition, rich in polyunsaturated fatty acids omega-3 of long chain, which the eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids play an important role in nutrition, health and welfare of the human being, preventing cardio diseases and promote the cognitive development.

Is important to determine and quantify these and other fatty acids, which are liberated from the food initial matrix, being available to be absorbed by the organism, which is, interesting to know what is the fatty acids bioaccessibility percentage and which are the most lipid classes found. Besides that, as the common consumer ingests mostly the food after being cooked, is relevant to know the influence of high temperatures and the addition of condiments in the food lipid composition.

This master dissertation pretends to verify the effect of drastic cook, in the chemical composition, especially in the lipid profile, of two distinct aquaculture fish species (salmon and meagre) and quantify the bioaccessibility percentage of each fatty acid in each of these species, both cooked and uncooked.

To choose these species were considered several aspects, although the lipid content was more determinant. Referring to the salmon, this specie has a very high fat content, which is classified as a very fat fish. The meagre is an emergent specie which has gained market position, not only for the sensory characteristics, but also because it reaches the commercial size and weight very quickly. Is a specie with a low lipid content, being classified as a thin specie. So these two species works as distinct models, one for fishes with a high lipid content and the other with low lipid content.

About the cook treatment, is required a drastic process but without external influences, mainly in the fat terms, which was chosen to the grill fish method, once we only add salt and the food temperature variation rate is high (although inferior to the fry process), as the temperature reached during the process (inferior to fry, but higher that the baking process).

To determine the bioaccessibility, defined as the fraction of some nutrients which are liberated from the food matrix during the digestive process, by putting the fish in a *in vitro* model. The simulation is simplified with the digestion in the mouth, stomach and small intestine, obeying the pH conditions, temperature, time retention in every step and the composition of the digestive juice.

With every sample prepared, cooked and fractionated, we call upon total lipids extraction methodologies (LT), based in the Bligh & Dyer (1959) techniques, chromatography of thin layer methodologies and fatty acids transesterification in esters (FAME – Fatty acid Methyl Esters), to respond to the described goals.

Through these methodologies is verified that in the initial phase, the dominant lipid class in every fraction sample studied is Triacylglycerols, although in the meagre the free fatty acids and phospholipids also has some expression in the initial composition. In the bioaccessible fraction, the lipid dominant class is the free fatty acids, presenting also, significant percentages of mono- and diacylglycerols, which are translated in a hydrolysis with a tax of 100% for triacylglycerols, revealing the digestive model applied is efficient. Also the hydrolysis of phospholipids proves the efficiency of the digestive model and the hydrolysis in salmon is favored by the cook treatment, but not in the meagre.

About the fatty acids, it can be seen that the cook treatment makes the concentration of fatty acids, although this effect isn't noted like the other fatty acids, which in the meagre, the cook treatment makes the concentration almost doubled in the eicosapentaenoic acid, while the concentration of docosahexenoic acid is only a little bit higher, opposing the situation verified in the salmon.

About the bioaccessibility, in the salmon the most bioaccessible fatty acids are polyunsaturated, with a percentage of 67.40% (uncooked) and 60.72% (cooked – grilled) and, inside of these, the docosahexaenoic acid is more bioaccessible with a percentage of 92.30% (salmon) and 60.22% (grilled salmon).

In the meagre, the fatty acids more bioaccessible are the saturated, with 86.51% in raw and 56.28% in grilled, thus revealing the consumption of salmon is more healthier.

Índice

Resumo.....	i
Abstract	ii
Extended Abstract	iii
1. Introdução.....	1
1.1. Setor das pescas: Aquacultura e a sua importância.....	2
1.2. Espécies de aquacultura: Salmão e Corvina.....	3
1.2.1. Salmão.....	3
1.2.2. Corvina.....	5
1.3. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca.....	7
1.3.1. Água.....	8
1.3.2. Proteínas.....	8
1.3.3. Lípidos.....	9
1.4. Efeitos do tratamento culinário/processamento nos lípidos do peixe.....	16
1.4.1. Efeito do tratamento culinário (grelhar) nos ácidos gordos do peixe.....	18
1.5. Bioacessibilidade	19
2. Material e Métodos.....	20
2.1. Delineamento, material e características gerais do estudo.....	20
2.1.1. Extração dos lípidos totais.....	21
2.1.2. Extração dos lípidos no bioacessível.....	23
2.1.3. Separação da fração não polar (TAG's) dos lípidos.....	24
2.1.4. Determinação de classes de lípidos por Cromatografia de camada fina.....	25
2.1.5. Determinação do perfil de ácidos gordos.....	28
3. Resultados.....	31
3.1. Salmão.....	31
3.1.1. Identificação e quantificação das classes lipídicas.....	31
3.1.3. Composição química do salmão cru e grelhado.....	33
3.1.4. Determinação do perfil de ácidos gordos do salmão e a influência do tratamento culinário.....	34
3.1.5. Determinação da bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão cru e no salmão grelhado.....	36
3.2. Corvina.....	38
3.2.1. Identificação e quantificação das classes lipídicas.....	39
3.2.3. Composição química da corvina crua e grelhada.....	40

3.2.4. Determinação do perfil de ácidos gordos da corvina e a influência do tratamento culinário.	41
3.2.5. Determinação da bioacessibilidade dos ácidos gordos na corvina crua e na corvina grelhada.	43
4. Discussão dos Resultados.	46
5. Conclusão.	50
6. Perspetivas Futuras.	51
Bibliografia.	53
Cibergrafia.	56
Anexos	I

Índice de Figuras

Figura 1: Evolução da produção mundial de peixes de aquacultura.	1
Figura 2: Salmão do Atlântico.	4
Figura 3: Produção mundial de salmão do atlântico, por aquacultura.	4
Figura 4: Corvina.	5
Figura 5: Produção mundial de corvina de aquacultura.	6
Figura 6: Representação esquemática das lipoproteínas HDL e LDL.	11
Figura 7: Alguns exemplos estruturais de ácidos gordos polinsaturados.	12
Figura 8: Processo de obtenção dos lípidos por ingestão alimentar.	14
Figura 9: Esquema representativo do riscado e pontos de aplicação na placa de TLC analítica.	26
Figura 10: Esquema representativo do riscado e pontos de aplicação da TLC preparativa.	28
Figura 11: TLC analítica do salmão cru e grelhado com os respetivos bioacessíveis.	31
Figura 12: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas no salmão cru A) e no bioacessível do salmão cru B).	32
Figura 13: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas no salmão grelhado A) e respetivo bioacessível B).	32
Figura 14: TLC preparativa do salmão cru.	34
Figura 15: TLC preparativa do salmão grelhado.	34
Figura 16: Composição em ácidos gordos da fração inicial do salmão cru e grelhado de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e, composição em EPA e DHA (C).	35
Figura 17: TLC preparativa do bioacessível do salmão cru.	36
Figura 18: TLC preparativa do bioacessível do salmão grelhado.	36
Figura 19: Percentagem de Bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão cru, de acordo com o nível de saturação (A), configuração ómega-3 e ómega-6 (B) e, percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).	37
Figura 20: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão grelhado de acordo com o nível de saturação (A), configuração ómega-3 e ómega-6 (B) e percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).	38
Figura 21: TLC analítica da corvina crua e respetivo bioacessível.	39
Figura 22: TLC analítica da corvina grelhada e respetivo bioacessível.	39
Figura 23: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas na corvina crua (A) e no respetivo bioacessível (B).	39
Figura 24: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas na corvina grelhada (A) e no bioacessível da corvina grelhada (B).	40
Figura 25: TLC preparativa da corvina crua.	41
Figura 26: TLC preparativa da corvina grelhada.	41
Figura 27: Composição em ácidos gordos, da fração inicial da corvina crua e grelhada, de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e composição em EPA e DHA (C).	42
Figura 28: TLC preparativa do bioacessível da corvina crua.	43
Figura 29: TLC preparativa do bioacessível da corvina grelhada.	43
Figura 30: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos da corvina crua de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e, percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).	44
Figura 31: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos na corvina grelhada, de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).	45

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição em ácidos gordos, por cada 100 g de parte edível, do Salmão do Atlântico.....	5
Tabela 2: Composição em ácidos gordos, por cada 100 g de parte edível, da Corvina legítima.....	7
Tabela 3: Composição geral dos produtos da pesca.....	8
Tabela 4: Diferentes métodos culinários.	17

Índice de Anexos

Anexo I: Modelo de digestão <i>In vitro</i>.....	I
Anexo II – Metodologias para determinação da composição química.....	IV
Anexo III: Cromatograma dos TAG do Salmão Cru inicial e respetivo relatório.....	VII
Anexo IV: Cromatograma dos TAG do salmão grelhado inicial e respetivo relatório.	IX
Anexo V: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos das amostras iniciais do salmão, em valores absolutos.....	XI
Anexo VI: Cromatograma do bioacessível do salmão cru e respetivo relatório.	XIV
Anexo VII: Cromatograma do bioacessível do salmão grelhado e respetivo relatório. .	XV
Anexo VIII: Perfil de ácidos gordos da solução de enzimas utilizada no ensaio de bioacessibilidade.....	XVIII
Anexo IX: Ajuste dos teores de gordura nas amostras de bioacessível do salmão.....	XIX
Anexo X: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos dos bioacessíveis do salmão, em valores absolutos	XX
Anexo XI: Metodologia para determinação da gordura total: SMEDES	XXIV
Anexo XII: Cromatograma dos TAG da corvina crua inicial e respetivo relatório.....	XXV
Anexo XIII: Cromatograma dos TAG da corvina grelhada inicial e respetivo relatório.	XXVIII
Anexo XIV: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos das amostras iniciais da corvina, em valores absolutos.....	XXX
Anexo XV: Cromatograma do bioacessível da corvina crua e respetivo relatório.	XXXIII
Anexo XVI: Cromatograma do bioacessível da corvina grelhada e respetivo relatório.	XXXV
Anexo XVII: Ajuste dos teores de gordura nas amostras de bioacessível da corvina.	XXXVII
Anexo XVIII: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos dos bioacessíveis da corvina, em valores absolutos.....	XXXVIII

1. Introdução.

Nas últimas décadas o consumidor comum tem vindo a apresentar uma preocupação crescente com o seu bem-estar e saúde, procurando praticar uma alimentação mais cuidada e saudável. Nesta perspetiva, assistiu-se a um aumento da procura e do consumo de produtos da pesca, em especial, depois de ser reconhecido o valor nutricional dos seus macroconstituintes, a sua importância como fonte de micronutrientes, minerais e ácidos gordos essenciais e os seus benefícios para a saúde e bem-estar ⁽¹⁾. Além destes fatores, também o aumento da variedade de escolha, pela introdução de novas espécies e produtos, contribuiu para o aumento desta procura ⁽²⁾.

Em Portugal, com base nos dados da FAO, o consumo anual de peixe e de produtos da pesca aumentou na última década, passando de 53 kg *per capita* para 61 kg *per capita*. Este aumento de consumo, não só em Portugal, mas também noutros países, levou à captura excessiva da pesca selvagem e impulsionou o crescimento dos produtos de aquacultura, como se pode ver na **figura 1**.

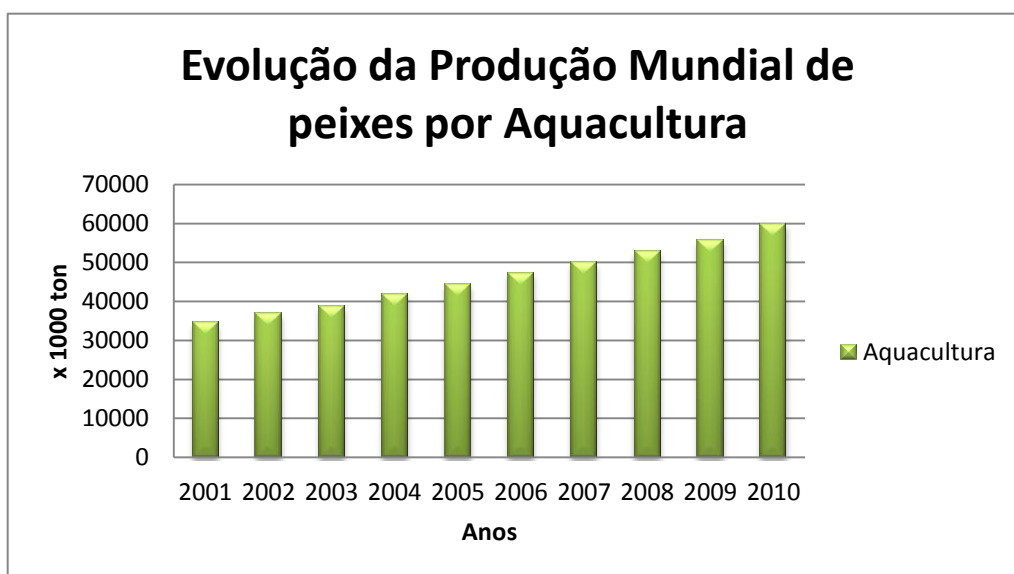


Figura 1: Evolução da produção mundial de peixes de aquacultura.

Adaptado de: FAO yearbook - Fishery and Aquaculture Statistics, 2010 ⁽³⁾.

A este nível, o salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758) é uma das espécies mais consumidas, assim como, o camarão. No entanto, novas espécies, como a corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801), têm vindo a ganhar uma maior importância neste mercado, dada a sua forma atrativa, bons valores nutricionais, baixo teor de gordura e um excelente sabor que a potencia enquanto espécie emergente ⁽⁴⁾.

Assim, dado o peso que os produtos da pesca têm na alimentação dos consumidores, é importante avaliar a composição e valor nutricional, não só das espécies mais consumidas, como das novas espécies produzidas por aquacultura, pois estas são alimentadas com rações enriquecidas para maximizar a sua taxa de crescimento, o que se traduz numa composição nutricional diferente da existente na carne dos exemplares selvagens da mesma espécie ⁽²⁾.

Por norma, os peixes apresentam um elevado teor proteico, vitamínico e mineral, assim como, uma interessante composição lipídica, rica em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 de cadeia longa (LC PUFA ω 3) ⁽²⁾, dos quais, o ácido eicosapentenoico (EPA) e o ácido docosa-hexenoico (DHA) desempenham um importante papel na nutrição, saúde e bem-estar do ser humano, prevenindo doenças cardiovasculares e promovendo o desenvolvimento cognitivo ⁽⁵⁾. Logo, assim como já foi realizado para outros alimentos, neste trabalho pretende-se avaliar a quantidade de ácidos gordos que é libertada da matriz inicial do peixe, aquando do processo digestivo, e que fica disponível para ser absorvida pelo organismo ⁽⁶⁾, ou seja, pretende-se saber qual a percentagem de bioacessibilidade de cada ácido gordo, em especial, dos ω 3 PUFA de cadeia longa, presente nas espécies de aquacultura analisadas.

No entanto, para que tenhamos valores mais próximos da realidade é necessário ter em consideração que, por norma, o consumidor apenas ingere o peixe após este ser sujeito a um tratamento culinário (cozer, fritar, assar, grelhar, entre outros) que lhe confira melhor sabor e aroma e permita aumentar o seu período de vida útil ⁽⁷⁾. Mas estes tratamentos culinários sujeitam o peixe a altas temperaturas que podem induzir alterações organolépticas e na composição inicial do alimento ⁽⁷⁾. Assim, este estudo tem como objetivos, analisar a influência que um tratamento culinário extremo (grelhar) tem no perfil lipídico das espécies de aquacultura em estudo e verificar a bioacessibilidade dos ácidos gordos em cru e após tratamento culinário.

É importante referir que este estudo está inserido no projeto *Goodfish*, em curso no Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P./ IPMA, na Unidade de investigação de valorização dos produtos da pesca e de aquacultura (UVPPA) e que teve de recorrer à adaptação das metodologias para o produto alimentar em causa, o peixe.

1.1. Setor das pescas: Aquacultura e a sua importância

Há muitos anos que o sector das pescas assume um importante papel, não só na alimentação das populações, mas também, enquanto atividade económica ⁽²⁾. No entanto, sucessivos desenvolvimentos de novas tecnologias e produtos contribuíram para

modificações neste sector e para a alteração dos padrões de consumo, aumentando a procura do pescado ⁽²⁾.

Para suprir as necessidades mundiais de procura destes produtos, sem pôr em causa a conservação e a gestão dos recursos pesqueiros naturais, surge a aquacultura ⁽⁸⁾, que desde 1970 tem vindo a contribuir para o abastecimento mundial de peixes, crustáceos e moluscos ⁽⁹⁾.

A produção aquícola Mundial teve o seu período de maior crescimento nos anos 80 e 90, embora continue a crescer nos tempos que decorrem, tendo atingido uma produção mundial de 79 milhões de toneladas em 2010 ⁽¹⁰⁾. Face a esta expansão, foi necessário melhorar e otimizar os padrões de produção, como a salinidade e a temperatura da água, assim como a adequação das rações fornecidas de acordo com as necessidades de cada espécie ⁽⁸⁾, o que veio permitir a diversificação deste sector.

Em 2010, estavam registadas na FAO 541 espécies de peixes, crustáceos, bivalves e algas de aquacultura, sendo que apenas 327 diziam respeito a peixes ⁽¹⁰⁾. Dentro destes, o salmão é uma das espécies mais produzidas e também das mais consumidas a nível mundial ⁽³⁾, o que justifica a sua utilização no estudo que se pretende desenvolver, tendo-a como referência de peixe com um teor lipídico mais elevado.

Quanto à corvina, esta não está referenciada como uma espécie de maior consumo ou produção a nível mundial. No entanto, tem vindo a ganhar terreno no mercado devido à sua facilidade de produção, ótimas características nutricionais e baixo teor lipídico, que a potenciam enquanto espécie emergente ⁽⁴⁾ e desperta o interesse para a realização deste estudo.

1.2. Espécies de aquacultura: Salmão e Corvina.

1.2.1. Salmão.

O salmão, *Salmo salar*, Linnaeus, 1758, é uma espécie pertencente à família *Salmonidae* e é caracterizado por um corpo alongado, coberto de pequenas escamas arredondadas e por uma cabeça pequena. É um peixe que pode atingir cerca de 1,5 metros de comprimento e pode pesar mais de 13 kg. Apresenta uma coloração parda, verde azulada no dorso e um prateado esbranquiçado no ventre ⁽¹¹⁾, como se pode ver na **figura 2**.



Figura 2: Salmão do Atlântico.

Fonte: FAO Fishery Statistics

Normalmente é encontrado no Atlântico Norte, quer do lado Europeu (Portugal e Rússia), quer do lado Norte-Americano, sendo também, muito frequente, no Reino Unido, Islândia e Gronelândia ⁽¹⁾. No entanto, desde 1960, altura em que surge a primeira cultura de “gaiola” na Noruega, que a sua cultura se espalhou por países como a Escócia, Irlanda, Canadá, Chile, Espanha e França ⁽¹⁾.

Contudo, a sua produção por aquacultura só se tornou relevante a partir de 1990, altura a partir da qual, teve um crescimento muito acentuado, o que se pode verificar na **figura 3**.

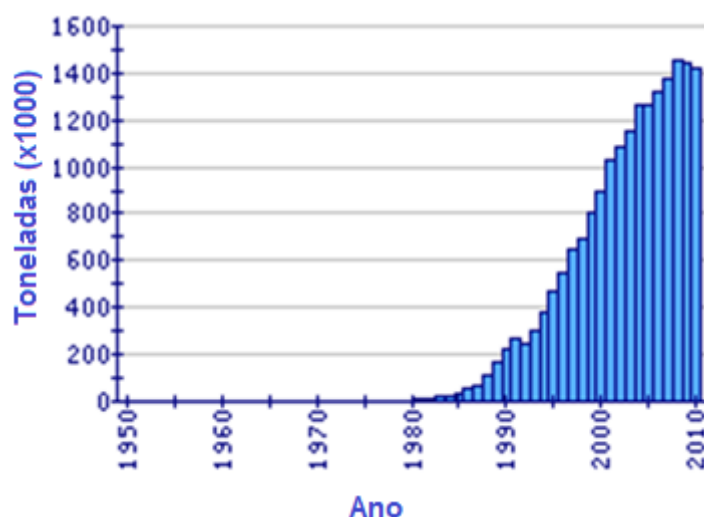


Figura 3: Produção mundial de salmão do atlântico, por aquacultura.

Fonte: FAO Fishery Statistics, 2006

Quanto à composição química e nutricional deste peixe, sabe-se que por cada 100 g de parte edível, que representa 89% do peixe, são fornecidas 267 kcal. Sendo de notar, que o Salmão é muito rico em gordura (22 g/100 g) e proteína (16 g/100 g) e apresenta cerca de 60 g de humidade e 1,3 g de cinza por cada 100 g de parte edível ⁽¹⁾.

Relativamente à gordura presente no salmão, esta é caracterizada pela presença de maiores quantidades de ácidos gordos monoinsaturados em detrimento dos saturados ⁽¹⁾, como mostra a **tabela 1**.

Tabela 1: Composição em ácidos gordos, por cada 100 g de parte edível, do Salmão do Atlântico.

Ácidos gordos	mg /100 g
16:0	2687,7
Σ Saturados	4291,3
18:1	3809,7
Σ Monoinsaturados	10037
18:2 ω 6	691,2
EPA	1172,1
DHA	1772,6
Σ Polinsaturados	5148,2
ω 3	4326,4
ω 6	765,6

Fonte: Bandarra *et al.*, (2004).

1.2.2. Corvina.

A corvina, classificada cientificamente como *Argyrosomus regius*, Asso, 1801, pertence à família *Sciaenidae* e caracteriza-se por ter uma cabeça relativamente grande, com a boca em posição terminal e um corpo alongado, que pode atingir os 2 metros de comprimento e 50 kg de peso. Normalmente apresenta uma coloração cinza prata no corpo e uma cor amarelada na zona da boca ⁽¹²⁾, como se pode ver na **figura 4**.



Figura 4: Corvina.

Fonte: FAO Fishery Statistics

Este peixe é característico de águas costeiras superficiais ou profundas, encontrando-se em todo o Mar Mediterrâneo, em especial, ao longo da costa ocidental africana, onde os peixes apresentam dimensões maiores ⁽¹²⁾.

No entanto, como a corvina se revelou uma espécie com grande potencial comercial (longo período de prateleira, atinge rapidamente o tamanho comercial), a França e a Itália

iniciaram, em 1996, a sua produção por aquacultura. Atualmente, estes dois países, juntamente com Portugal e Espanha, são os grandes produtores mundiais de corvina ⁽¹²⁾.

A produção mundial desta espécie foi, sem dúvida, impulsionada na última década, tendo passado de 231 toneladas, em 2002, para 15 000 toneladas no ano de 2010 ⁽¹²⁾ (**figura 5**), o que torna a corvina numa espécie de especial interesse.

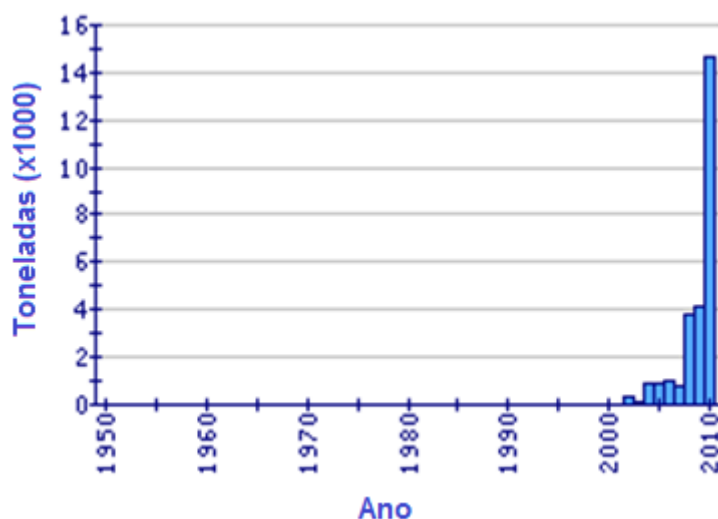


Figura 5: Produção mundial de corvina de aquacultura.

Fonte: FAO Fishery Statistic

Quanto à composição química e nutricional, a corvina, por cada 100 g de parte edível (75%), fornece 100 kcal e contém 20 g de proteína, 77 g de humidade, 1,2 g de cinza e 1,4 g de gordura ⁽¹⁾.

Esta gordura contém uma maior quantidade de ácidos gordos monoinsaturados, em detrimento dos polinsaturados, embora as suas quantidades não difiram muito, como se podem ver na **tabela 2**.

Tabela 2: Composição em ácidos gordos, por cada 100 g de parte edível, da Corvina legítima

Ácidos gordos	mg /100 g
16:0	234,7
Σ Saturados	342,0
18:1	144,2
Σ Monoinsaturados	465,0
18:2ω6	8,0
EPA	5,7
DHA	147,0
Σ Polinsaturados	233,8
ω3	216,1
ω6	17,7

Fonte: Bandarra *et al.*, 2004.

1.3. Composição e valor nutricional dos produtos da pesca.

Os produtos da pesca são alimentos fundamentais numa dieta equilibrada, apresentando um alto valor nutricional e fornecendo compostos essenciais ao crescimento e desenvolvimento do organismo humano.

Mas, é importante lembrar, que a composição e valor nutricional dos produtos da pesca varia de espécie para espécie e, até mesmo, entre indivíduos da mesma espécie de acordo com o grau de maturação sexual, com a época em que foi capturado, com a quantidade e tipo de alimento que teve disponível, com a temperatura da água, o pH e a salinidade da mesma, assim como, com a zona geográfica onde se encontrava e com os padrões de migração ⁽²⁾.

No caso do pescado de aquacultura, estas variações são mais facilmente controladas e previsíveis, uma vez que, a composição e o valor nutricional destes produtos dependem, essencialmente, das condições de produção e da composição da ração fornecida, que são manipuladas e formuladas de acordo com a espécie produzida ⁽²⁾.

No entanto, de uma forma geral, os principais constituintes dos produtos da pesca são a água, as proteínas e os lípidos, embora também apresentem uma percentagem minoritária de compostos como os sais minerais, hidratos de carbono e vitaminas ⁽²⁾. **(tabela 3)**

Tabela 3: Composição geral dos produtos da pesca.

Constituintes	g/100 g parte edível
Água (humidade)	50 a 85
Proteínas	12 a 24
Lípidos	0,1 a 22
Compostos minoritários (Minerais, hidratos de carbono, vitaminas)	0,8 a 2

Fonte: Nunes, Maria Leonor, *et al.*, 2008.

Atualmente considera-se que a grande importância dos produtos da pesca decorre dos seus compostos maioritários, em especial, dos lípidos. Por isso, de seguida são descritos esses compostos, dando especial destaque aos lípidos.

1.3.1. Água.

É o principal constituinte do músculo do pescado e varia na razão inversa do teor lipídico. Normalmente, as espécies magras apresentam um teor de água mais elevado do que as espécies gordas, sendo esta variação mais acentuada, aquando da época de postura, onde ocorre uma redução das reservas energéticas do pescado ⁽⁸⁾.

1.3.2. Proteínas.

São macromoléculas constituídas por carbono (C), hidrogénio (H) e azoto (N), que se distribuem, no músculo do peixe, em três grupos:

- Proteínas Miofibrilares: representam 70 a 80% do teor total de proteínas e fazem parte do sistema contrátil do músculo;
- Proteínas Sarcoplasmáticas: englobam a mioglobina e múltiplas enzimas, representando 25 a 30% do teor proteico total;
- Proteínas do Tecido Conjuntivo: São proteínas extracelulares presentes no colagénio e na elastina e representam 3 a 10% do teor total de proteínas ⁽²⁾.

Normalmente, o teor de proteínas nos produtos da pesca é bastante estável, não se verificando alterações significativas ao longo do seu ciclo de vida, o que é importante, dado o elevado valor biológico destes componentes para o crescimento e desenvolvimento de funções vitais do organismo humano ⁽⁴⁾.

1.3.3. Lípidos.

Muitas vezes referidos como óleos ou gorduras, de acordo com o seu estado físico à temperatura ambiente, os lípidos são biomoléculas compostas por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) e que apresentam propriedades físicas, químicas e fisiológicas que os tornam muito importantes na dieta humana ⁽¹³⁾.

Estruturalmente são compostos muito heterogêneos, tendo como denominador comum o fato de serem imiscíveis na água e solúveis em solventes orgânicos como o éter e o clorofórmio ⁽¹⁴⁾.

Normalmente estão presentes na composição de estruturas membranares biológicas, dadas as suas propriedades homeostáticas, e têm um importante papel ao nível do isolamento térmico e do depósito de reservas energéticas. Podem também atuar como cofatores enzimáticos, mensageiros intracelulares e transportadores de eletrões, podendo ainda desempenhar funções hormonais ⁽¹³⁾.

No peixe, os lípidos distribuem-se pelos tecidos subcutâneos, aba da barriga, tecido muscular, fígado, tecido mesentérico e cabeça, diminuindo a sua quantidade desde a cabeça até à cauda, onde se localizam os músculos utilizados para nadar. Estes músculos dividem-se em músculo branco, responsável por movimentos rápidos e súbitos, e músculo escuro, normalmente usado nos movimentos de navegação, mais lentos e regulares, sendo mais rico em lípidos que o músculo branco ⁽⁵⁾.

Mas como já foi referido, o teor lipídico do pescado varia ao longo do seu ciclo de vida, dependendo da alimentação e da fase de reprodução em que se encontra ⁽⁸⁾. Logo, é difícil haver um consenso na classificação do pescado de acordo com este fator, havendo na literatura, várias classificações possíveis.

Segundo de Lambertsen (1978), a classificação é feita da seguinte forma:

- **Magro:** menos de 2 % de gordura;
- **Pouco gordo:** de 2 a 4 % de gordura;
- **Meio gordo:** de 4 a 8 % de gordura e
- **Muito gordo:** superior a 8 % de gordura.

1.3.3.1. Classes lipídicas nos produtos da pesca.

Nos produtos da pesca, os lípidos são compostos, na sua maioria, por **Triacilgliceróis** (TAG) e **Fosfolípidos** (PL), que variam numa razão inversa de acordo com o teor lipídico ⁽¹⁵⁾. No entanto, o **Colesterol** (CH), produtos metabólicos destes e pequenas quantidades de lípidos pouco usuais, tais como, glicolípidos e sulfolípidos, também fazem parte dos lípidos presentes no pescado ⁽⁵⁾.

- Os **Triacilgliceróis** são lípidos de reserva, com um poder calórico tanto maior, quanto maior o teor lipídico nos músculos do peixe ⁽¹⁵⁾. São formados por uma molécula de glicerol em que cada grupo hidroxílico se encontra esterificado com uma molécula de um ácido gordo livre ⁽¹⁶⁾.

- Os **Fosfolípidos** ou **glicerofosfolípidos** são lípidos estruturais, abundantes nas membranas dos tecidos dos animais e são formados por duas moléculas de ácidos gordos apolares ligados a uma molécula de glicerol que, por sua vez, está ligado a um fosfato. Esse fosfato poderá estar ligado a outra molécula de glicerol, a uma amina, ou a um aminoácido dando origem a diferentes classes de fosfolípidos ⁽¹⁶⁾.

- O **Colesterol (Figura 10)** é o principal esteroide presente em produtos da pesca, normalmente em níveis entre os 20 e os 85 mg/100 g, e é de extrema importância para a fluidez das membranas celulares ⁽¹⁴⁾.

De uma forma geral, tanto o colesterol como os fosfolípidos e os triacilgliceróis são transportados na corrente sanguínea por diferentes tipos de lipoproteínas, macromoléculas que possuem densidade inferior à das proteínas e que são tão menos densas quanto mais ricas forem em lípidos ⁽¹⁷⁾. As mais importantes, relativamente ao colesterol, são:

- ✓ **Lipoproteína de baixa densidade (LDL):** lipoproteína rica em ésteres de colesterol, cuja principal função é o transporte do colesterol do fígado para as células e tecidos periféricos, intervindo ainda na regulação da síntese de colesterol nesses tecidos ⁽⁷⁾ **(figura 6)**.

- ✓ **Lipoproteína de alta densidade (HDL):** sintetizada no fígado e contendo um alto teor de fosfolípidos e colesterol, desempenha um importante papel no transporte de 15 a 40% do colesterol total do plasma e no transporte do colesterol em excesso nos tecidos periféricos para o fígado, onde é catabolizado ⁽⁷⁾ **(figura 6)**.

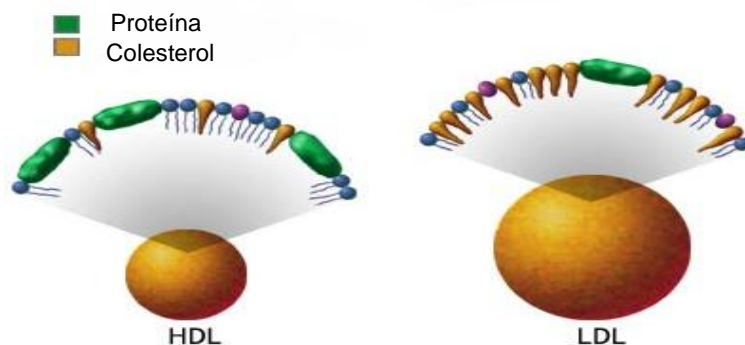


Figura 6: Representação esquemática das lipoproteínas HDL e LDL.

Fonte: <http://www.umm.edu>

1.3.3.2. Ácidos gordos: Unidade mais simples dos lípidos.

Os ácidos gordos (FA) são compostos orgânicos simples, constituídos por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) e que num dos extremos da cadeia alquilo apresentam um grupo carboxílico (-COOH), que lhe confere um carácter ácido, e no extremo oposto tem um grupo metilo (-CH₃) não funcional ⁽⁷⁾. Na sua maioria, encontram-se sob a forma esterificada em glicerol (mono-, di- e triglicerol) ou sob a forma dos seus derivados (glicolípidos, fosfolípidos e ésteres de colesterol), podendo apresentar-se ainda como ácidos gordos livres (FFA) ⁽¹³⁾.

Podem classificar-se de acordo com o comprimento e grau de insaturação da cadeia de carbono. Assim, uma cadeia com 4 a 6 carbonos é classificada como pequena, com 8 a 12 é média, com 14 a 20 é considerada longa e com mais de 20 é uma cadeia muito longa ⁽¹³⁾. Quanto ao grau de insaturação, os ácidos gordos dividem-se em três grandes grupos, os ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA).

- **Ácidos gordos Saturados (SFA):** não apresentam qualquer ligação dupla na sua estrutura molecular. No pescado, o ácido palmítico (C16:0), o ácido mirístico (C14:0) e o ácido esteárico (C18:0) são os ácidos gordos saturados mais representativos ⁽¹⁴⁾.

- **Ácidos gordos monoinsaturados (MUFA):** são ácidos gordos que possuem apenas uma ligação dupla na sua estrutura ⁽¹³⁾. Por norma, os mais dominantes no pescado são o ácido oleico (C18:1 n-9) e o ácido palmitoleico (C16:1 n-7) ⁽¹⁴⁾, sendo importante referir que são os ácidos gordos mais dominantes em pescado de aquacultura, refletindo o perfil do alimento que lhes é fornecido ⁽⁴⁾.

(Os ácidos gordos saturados e monoinsaturados tendem a ser esterificados, preferencialmente, nas posições *sn-1* e *sn-3* dos TAG⁽¹⁴⁾.)

- **Ácidos gordos Polinsaturados (PUFA):** apresentam duas ou mais ligações duplas (até um máximo de seis ligações duplas) na sua estrutura⁽¹⁴⁾ (**Figura 7**).

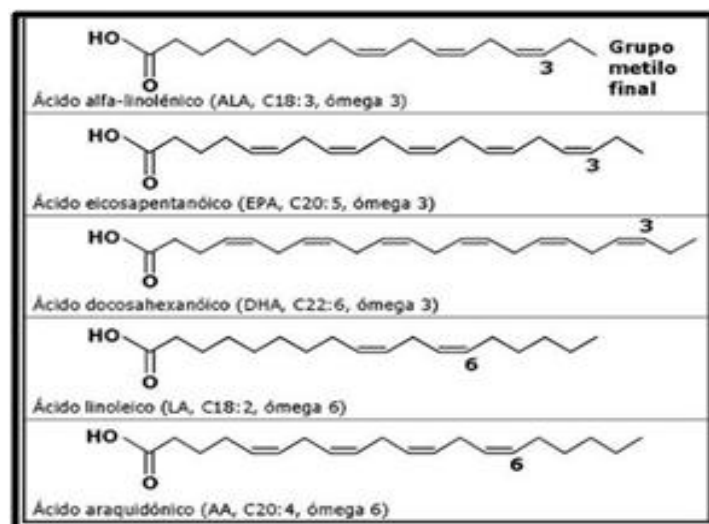


Figura 7: Alguns exemplos estruturais de ácidos gordos polinsaturados.

Fonte: <http://www.eufic.org/article/pt/nutricao/gorduras/artid/importancia-dos-acido-gordos-omega-3-e-omega-6/>

No pescado, os PUFA são normalmente de cadeia longa (LC) e com configuração ómega 3 ($\omega 3$), o que significa que a primeira dupla ligação se encontra no 3º carbono a contar do terminal metilo, ou ómega 6 ($\omega 6$), onde a primeira ligação dupla se encontra no 6º carbono a contar do terminal metilo. No caso dos $\omega 3$ PUFA, os mais abundantes são o ácido eicosapentenoico (20:5 $\omega 3$ ou EPA) e o ácido docosahexenoico (22:6 $\omega 3$ ou DHA), enquanto nos ($\omega 6$) PUFA domina o ácido linoleico (18:2 $\omega 6$ ou LA). Estes ácidos tendem a ser, preferencialmente, esterificados na posição *sn-2*⁽¹⁴⁾.

De uma forma geral, os ácidos gordos encontrados nos produtos da pesca, apresentam um número par de átomos de carbono na sua estrutura, uma configuração *cis* e o seu perfil e quantidade variam de espécie para espécie⁽²⁾

1.3.3.3. Metabolismo lipídico.

No corpo humano, os lípidos podem ser obtidos por duas vias: a via exógena (obtenção através do consumo de alimentos) e a via endógena (biossíntese a partir de outros compostos, como por exemplo a glucose)⁽¹⁸⁾.

A **via exógena** é fundamental para a obtenção de ácidos gordos essenciais e é composta por três fases (**figura 8**):

- **Digestão:** É um processo complexo que se inicia na boca, onde os alimentos são mastigados e misturados com o auxílio da saliva (lipase lingual, amílase salivar, lisozima e mucina), formando o bolo alimentar que segue para o estômago onde, por ação do suco gástrico (contendo lipase gástrica), ocorre a hidrólise de 10 a 30% da gordura ⁽¹⁹⁾.

Após esta pré-digestão, o bolo alimentar segue para o duodeno (primeira parte do intestino delgado) onde é envolvido em ácidos biliares e se formam pequenas micelas, aumentando a superfície exposta e possibilitando a hidrólise dos triacilgliceróis em 2-monoacilgliceróis e ácidos gordos livres, e a hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol e ácidos gordos livres, pela lipase pancreática existente no suco pancreático. Os fosfolípidos, por sua vez, são hidrolisados pelas fosfolipases A2 (PLA2) em lisofosfolípidos e ácidos gordos ⁽⁶⁾.

- **Absorção:** esta fase consiste no transporte do material resultante da hidrólise, para as células da mucosa intestinal, onde é reconstituído. Assim, os ácidos gordos de cadeia curta e/ou média são absorvidos diretamente pelo intestino delgado (por difusão) e são oxidados no fígado depois de serem transportados por via venosa ⁽⁶⁾, enquanto os restantes produtos da hidrólise (ácidos gordos de cadeia longa, 2-monoacilgliceróis, lisofosfolípidos e colesterol) são emulsionados com sais biliares e lecitina, formando micelas. Estas são absorvidas pela mucosa intestinal e os seus constituintes são convertidos, novamente, em ésteres de ácidos gordos (triacilgliceróis, fosfolípidos e éster de colesterol), que se unem a apolipoproteínas (proteína à qual se liga o colesterol-HDL (Apolipoproteína-A) ou ao colesterol-LDL (Apolipoproteína-B)), formando as quilomícras ⁽⁶⁾.

As quilomícras são lipoproteínas produzidas pelas células intestinais e são compostas por 85 a 95% de triglicéridos, uma pequena quantidade de colesterol livre, fosfolípidos e 1 a 2% de proteínas ⁽¹⁷⁾.

- **Transporte:** é a última fase do metabolismo e envolve a transferência dos lípidos absorvidos da mucosa intestinal para os tecidos, através do sistema linfático e sanguíneo ⁽¹⁹⁾.

Na corrente sanguínea, os TAG das quilomícras são hidrolisados, pela lipoproteína lipase, em ácidos gordos livres e glicerol que passam para as células, onde são utilizados como energia ou armazenados no tecido adiposo ⁽⁶⁾. Através dos recetores das lipoproteínas HDL e LDL do fígado, os outros elementos das quilomícras são eliminados da circulação ⁽⁶⁾,

sendo novamente sintetizados em triacilgliceróis (a partir de ácidos gordos) e lipoproteínas de baixa densidade, designadas de VLDL. Estas lipoproteínas são o principal transportador de TAG e são o substrato para a ação da lipase lipoproteica do endotélio, que fornece também, ácidos gordos livres aos tecidos muscular e adiposo e transfere os ésteres de colesterol do plasma para os tecidos periféricos, onde são hidrolisados em colesterol livre e são novamente esterificados ⁽⁶⁾.

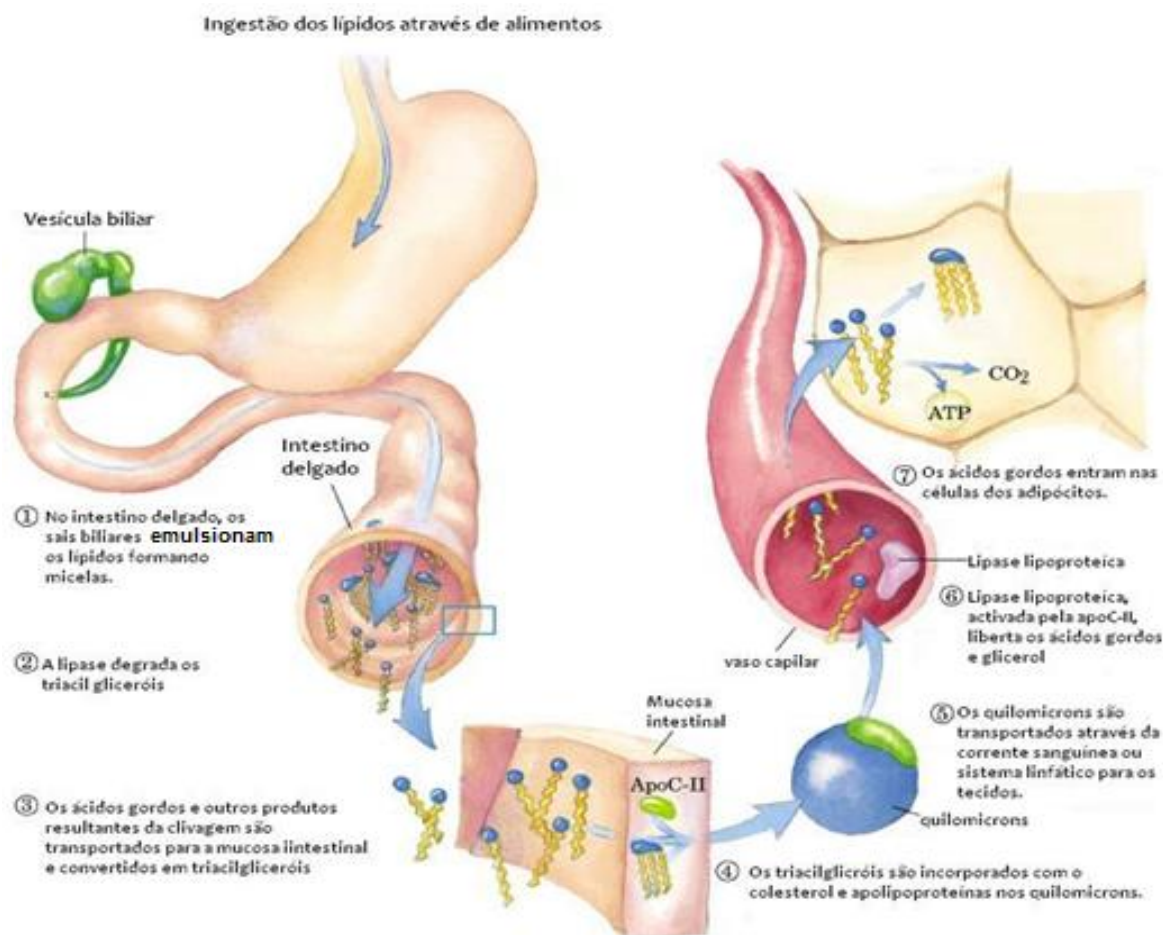


Figura 8: Processo de obtenção dos lípidos por ingestão alimentar.

Fonte: <http://biointerativafisio.blogspot.pt/2010/12/metabolismo-de-lipideos-oii-gente-neste.html>

É importante salientar que a estrutura de certos alimentos pode influenciar a aparente biodisponibilidade dos lípidos, assim como as propriedades físicas e químicas de cada ácido gordo.

Tomando em consideração o grau de insaturação dos ácidos gordos, os monoinsaturados são mais facilmente absorvidos do que os polinsaturados, uma vez que são solúveis na fase aquosa do meio intestinal ⁽¹⁸⁾

1.3.3.4. Importância dos lipídios do peixe na nutrição humana.

Os lipídios são constituídos por compostos responsáveis pelo sabor, aroma e textura de um alimento, facilitando assim, a aceitação por parte do consumidor ⁽⁶⁾. Além disso, têm a capacidade de prolongar a sensação de saciedade, facilitam a absorção de vitaminas lipossolúveis e fornecem ácidos gordos essenciais (EFA), aqueles que o organismo humano não é capaz de sintetizar (LA e ALA) ⁽⁶⁾.

No entanto, nem todos os ácidos gordos têm um efeito benéfico no organismo humano, como é o caso dos ácidos gordos saturados (SFA) que, contribuem para o aumento dos níveis de colesterol no sangue e aumentam a predisposição para a aterosclerose e para trombooses ⁽⁸⁾.

Efeito contrário têm os MUFA e os PUFA, normalmente presentes em maior quantidade nos produtos da pesca, e que contribuem para a redução dos níveis de triacilgliceróis no plasma e da atividade plaquetária ⁽²⁰⁾.

Segundo Kolakoska e Dunstan (2003), os ácidos gordos polinsaturados ω 3 de cadeia longa são muito importantes para a nutrição, saúde e bem-estar do ser humano, uma vez que previnem doenças cardiovasculares, o colesterol elevado, arritmias, enfartes, a artrite reumatoide, obesidade, diabetes, asma e problemas de visão e de índole neurológica. Além disso, os PUFA apresentam atividade antiarrítmica e anti trombótica, reduzindo a pressão arterial e o risco de hemorragia cerebral.

Dentro dos PUFA, o ácido docosa-hexenóico (DHA) é dos mais importantes para o desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, tanto que, baixos níveis de DHA no tecido cerebral e retina se traduzem em disfunções no sistema nervoso central, manifestadas na forma de irritabilidade, suscetibilidade ao *stress*, dislexia, agressividade, reduzida capacidade de aprendizagem, memória e função cognitiva enfraquecida (observável em doentes de *Parkinson*, *Alzheimer* e esclerose lateral amiotrófica) e tempo de reação mais demorado ⁽⁵⁾.

O ácido araquidónico (AA) também está muito associado à transmissão sináptica e ao desenvolvimento do cérebro e da retina, principalmente durante o período de gestação e nos primeiros anos de vida, assumindo especial relevância na alimentação de mulheres no terceiro trimestre de gravidez e durante a amamentação dos recém-nascidos ⁽²⁰⁾.

Segundo Kolakowska e Dunstan, (2003), uma única refeição de peixe por semana reduz em 52% o risco de morte súbita e 70% o risco de paragem cardíaca, sendo esta a dose mais baixa recomendada. Uma dieta de 2 semanas contendo 3 refeições de peixe por

semana reduz os níveis de triglicéridos em 30%, o colesterol em 15% e o colesterol-LDL, também em 15%. No entanto, apesar de todos os benefícios apresentados, quando a ingestão destes lípidos é excessiva, podem haver efeitos negativos.

Quando se ingere uma dose excessiva, superior a 3 g/dia podem aparecer alguns distúrbios intestinais e se a dose for superior a 7 g/dia, os efeitos negativos são mais graves, podendo levar a hemorragias internas, dada a fluidez do sangue, ou a alterações nos níveis de glucose em diabéticos, danos oxidativos, resultantes da formação de radicais livres e de hidroperóxidos que desencadeiam a peroxidação lipídica ⁽⁵⁾.

1.4. Efeitos do tratamento culinário/processamento nos lípidos do peixe.

Normalmente, o ser humano ingere os alimentos depois de processados e/ou cozinhados, e o peixe não é exceção. Existe uma grande variedade de processamentos e de tratamentos culinários que podem ser, mais ou menos agressivos, de acordo com o fator temperatura e com a adição de outros ingredientes, ao gosto e preferência do consumidor.

Segundo Y. Moradi *et al*, (2011), os métodos culinários podem dividir-se em três categorias, de acordo com o tipo de calor utilizado.

- **Métodos de calor seco**, que cozinham os alimentos utilizando ar quente ou gordura;
- **Métodos de calor húmido**, que utilizam um meio líquido (água, caldo ou vapor) para cozinhar e
- **Métodos que combinam o calor seco e o calor húmido.**

Na **tabela 4** estão especificados os diferentes métodos culinários, com o respetivo tipo de calor e meio utilizado.

Tabela 4: Diferentes métodos culinários.

Tipo de Calor	Meio utilizado	Métodos Culinários
Calor seco	Ar seco ou gordura	Fritar
		Panar
		Grelhar
		Tostar
		Assar
Calor húmido	Água, caldo ou vapor	Escalfar
		Ferver
		Cozer a vapor
Calor seco+Calor húmido	-	Refogar
		Estufar

Adaptado de Moradi *et al.*, 2011

Todos estes métodos provocam alterações na composição química, no perfil de ácidos gordos e de aminoácidos, nos aspetos sensoriais e, até mesmo, na digestibilidade dos produtos da pesca ⁽²¹⁾. Contudo, estas alterações dependem de fatores como o tipo de armazenamento a que o peixe foi sujeito, a espécie a que pertence, a época de captura, o nível de maturação e do binómio tempo/temperatura a que foi submetido aquando da sua preparação culinária ⁽⁷⁾.

Por norma, após o tratamento culinário e, consequente exposição a temperaturas elevadas, é verificada uma perda significativa de água do pescado, o que promove a concentração de todos os outros constituintes, revelando-se num aumento percentual dos teores proteico e lipídico ⁽²²⁾.

Os lípidos são, sem dúvida, os constituintes mais afetados pelo aumento da temperatura, verificando-se alterações, não só no seu conteúdo, como na sua composição. Contudo, essas alterações são diferentes consoante o tipo de tratamento culinário utilizado. Assim, a fritura é o tratamento que promove maiores alterações, devido à absorção do óleo de fritura e à perda de humidade. A cozedura em água., por sua vez, é considerada o tratamento culinário mais saudável e que provoca menos alterações na composição lipídica dos alimentos ⁽²³⁾.

Grelhar, é também uma das formas apontadas, como benéfica, para o consumo de peixe, uma vez que a taxa de variação da temperatura do alimento é inferior à da fritura e a temperatura atingida durante o processo é superior à da cozedura, mas inferior à fritura ⁽¹³⁾.

As alterações provocadas por este processo culinário são a perda significativa de água, levando à concentração dos níveis de cálcio, fósforo, magnésio, potássio e zinco, o aumento de cinza, normalmente influenciado pela adição de sal, a desnaturação proteica e a diminuição dos teores lipídicos totais, de ácidos gordos e colesterol ⁽²⁴⁾.

Além disso, a exposição a altas temperaturas pode levar à ocorrência das chamadas, reações de Maillard, entre os aminoácidos e os glúcidos presentes no peixe ⁽¹⁴⁾. Estas reações consistem na interação do grupo carbonilo ($=O$) dos glúcidos com o grupo amina ($-NH_2$) do aminoácido ou proteína, produzindo, após várias etapas, as melanoidinas que dão a cor e o aspeto característico dos alimentos cozinhados ⁽²⁵⁾.

1.4.1. Efeito do tratamento culinário (grelhar) nos ácidos gordos do peixe.

De acordo com Kalakowska e Dunstan, (2003), os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, em especial o EPA e o DHA, são particularmente suscetíveis à oxidação, tendendo a diminuir quando sujeitos a tratamentos culinários.

Segundo outros estudos realizados, verifica-se que o tratamento culinário em causa poderá levar à alteração química do pescado, dada a elevada perda de água e a consequente concentração dos restantes componentes, ao nível muscular ⁽²⁶⁾.

Relativamente ao teor lipídico, sabe-se que os ácidos gordos são tanto mais estáveis ao calor, quanto menor for o seu grau de insaturação ⁽²⁴⁾, o que se traduz em alterações não homogêneas para os diferentes ácidos gordos presentes no peixe ⁽²⁷⁾.

Estudos revelam que com o aumento da temperatura há uma concentração do teor de ácidos gordos saturados (SFA), onde o ácido mais dominante é o ácido palmítico, do teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), onde o ácido oleico é o mais representativo e verifica-se também a concentração dos PUFA, com o ácido linoleico a ser dominante ⁽⁸⁾.

No entanto, nalguns casos, registou-se o decréscimo da concentração dos ácidos gordos polinsaturados, normalmente associado a espécies mais gordas, onde a gordura é mais subcutânea e mais afetada pelas temperaturas elevadas ⁽⁸⁾. Além disso, de acordo com Moradi *et al*, (2011) ⁽¹⁵⁾, o processo de grelhar o peixe pode fazer surgir alguns ácidos gordos (C14:1 n-5, C20:0, C22:0, e C22:1 n-9) que não eram detetados inicialmente no peixe ou filetes crus.

1.5. Bioacessibilidade

A bioacessibilidade, segundo Karin *et al.* (2003), descreve a quantidade de um determinado composto em estudo, que é libertada da matriz do alimento e fica disponível para absorção pelo organismo, uma vez que a quantidade de nutrientes que o organismo humano recebe, não é igual a quantidade desses mesmos nutrientes, no alimento inicialmente ingerido ⁽¹⁵⁾.

No entanto, muitas vezes utiliza-se o termo biodisponibilidade, quando falamos de bioacessibilidade, sendo importante evidenciar que são dois termos diferentes, embora relacionados, pois para que os nutrientes ou compostos se tornem biodisponíveis têm, primeiramente, que se tornar bioacessíveis ⁽⁶⁾.

O conceito de biodisponibilidade tem diferentes interpretações na literatura consultada, mas de acordo com a interpretação adaptada no contexto deste trabalho, define-se biodisponibilidade com a fração de nutrientes, libertados da sua matriz alimentar e transportados através do epitélio intestinal, que chega à circulação sistêmica ⁽⁶⁾.

A bioacessibilidade, por sua vez, é um conceito unânime na literatura, sendo descrita como a fração de nutrientes que é libertada da sua matriz alimentar, durante o processo digestivo, tornando-se disponível para absorção pelo organismo, podendo ser expressa pela razão entre a quantidade de nutriente libertada da matriz alimentar e a quantidade desse mesmo nutriente na matriz alimentar ⁽⁶⁾. Experimentalmente é obtida pela percentagem de elementos recuperados no sobrenadante, após a digestão *in vitro* ⁽²⁸⁾.

A matriz alimentar considerada foi o peixe, uma importante fonte de nutrientes, constituída por água (50 a 85%), proteínas (12 a 24%) e lípidos (0,1 a 22%), que representam cerca de 98% da parte edível. Os restantes 2,0% dizem respeito a compostos minoritários, dos quais se salientam os sais minerais, glúcidos e as vitaminas. Atualmente, a ênfase dada à necessidade do aumento do consumo do pescado prende-se com a sua composição em termos lipídicos, sendo este o foco deste estudo ⁽⁴⁾.

Tendo a matriz e a sua composição, é necessário relembrar, que esta pode sofrer algumas alterações físico-químicas, sensoriais e, até mesmo, nutricionais, quando processada e/ou cozinhada, influenciando a bioacessibilidade de determinados compostos na formulação final ⁽²⁹⁾.

A determinação da bioacessibilidade dos nutrientes pode ser realizada através de diferentes abordagens analíticas, como os estudos da digestão e absorção *in vivo*, baseados em balanços de massa, que determinam a quantidade de nutriente absorvida,

pela diferença entre as quantidades ingeridas e as quantidades excretadas, ou com base na concentração encontrada nos tecidos, que consiste na monitorização do aumento da concentração do nutriente no plasma. No entanto, estas abordagens, aplicadas em modelos animais experimentais são complexas, demasiado caras e algo limitadas ⁽³⁰⁾

Em contraste, as metodologias *in vitro* podem ser simples, rápidas e de custos moderados, apresentando-se assim como uma alternativa apelativa a estudos humanos ou animais ⁽¹⁵⁾. Estas metodologias simulam as condições fisiológicas e a sequência de processos que ocorre durante a digestão no trato gastrointestinal humano ⁽³⁰⁾.

Normalmente, os modelos de digestão *in vitro* para determinação da bioacessibilidade simulam, de forma simplificada, apenas os processos envolvidos na digestão na boca, estômago e no intestino delgado (Anexo I), excluído o trato no intestino grosso pois não está envolvido na absorção de compostos ⁽³¹⁾. Para que os resultados sejam à semelhança dos obtidos na digestão *in vivo* têm que se aplicar condições fisiológicas básicas iguais ou semelhantes, tais como a composição química dos fluidos digestivos, o pH e tempo de residência típico de cada compartimento ⁽²⁹⁾.

Depois da ingestão da matriz alimentar, os nutrientes podem ser, parcialmente ou totalmente, libertados durante a digestão no trato gastrointestinal, sendo a fração mobilizada definida como fração bioacessível.

Esta fração é considerada, a quantidade máxima de nutrientes que fica disponível para ser transportada através do epitélio intestinal.

2. Material e Métodos.

2.1. Delineamento, material e características gerais do estudo.

No presente trabalho, o material biológico referente às duas espécies em estudo, Salmão (*Salmo salar*) e Corvina (*Argyrosomus regius*), foi fornecido, já previamente preparado, pelo IPMA no âmbito do projeto GoodFish.

Relativamente ao salmão foram adquiridas trinta postas, provenientes de aquacultura, num mercado português. Para cada tratamento culinário, incluindo o cru, foram constituídas três alíquotas, cada uma composta por duas postas.

No caso da corvina, adquiriram-se sessenta corvinas do centro de investigação de aquacultura do IPMA em Olhão e, para cada tratamento culinário (incluindo o cru), foram constituídas cinco alíquotas, cada uma composta por três peixes.

Para o tratamento culinário procedeu-se à lavagem, remoção da cabeça e das escamas, evisceração e filetagem das corvinas e apenas à lavagem, no caso das postas de salmão, para posteriormente se salgar, de ambos os lados, com 1,5 g de sal por cada 100 g de peixe. O peixe foi grelhado num grelhador doméstico (Flama Sketch 230v, 50Hz, 2000W) durante 20 minutos (10 minutos de cada lado).

Na preparação das amostras cruas e cozinhadas apenas o músculo foi utilizado para constituir as alíquotas, procedendo-se à remoção da pele e das espinhas, homogeneizando-se apenas a parte comestível. Posteriormente congelaram-se e armazenaram-se as amostras, a -80 °C, até à realização das análises pretendidas. Excecionalmente, as amostras destinadas à análise de ácidos gordos, aminoácidos e de alguns elementos minerais foram congeladas a -20 °C e depois, liofilizadas por 48 horas a -45 °C e a uma pressão de aproximadamente 10^{-1} atm, sendo no final, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C até se proceder a mais análises.

Parte destas amostras, cruas e grelhadas, foram sujeitas a um ensaio de bioacessibilidade, onde se simula as diferentes etapas da digestão, de forma a se obter a fração bioacessível correspondente a cada amostra. O procedimento para obtenção desta fração é descrito no **anexo I**, uma vez que não foi efetuado no decorrer deste estudo, pois a fração bioacessível foi fornecida pelo IPMA.

Tendo as amostras, já previamente preparadas, o plano de investigação passou pela extração dos lípidos totais nas amostras cruas, devidamente cozinhada e depois de digeridas, através de um método de digestão *in vitro*. Depois, fez-se a determinação das diferentes classes, separando a fração polar da não polar, dos lípidos extraídos que, depois de fracionados, foram então sujeitos a uma análise cromatográfica para determinação do perfil de ácidos gordos.

2.1.1. Extração dos lípidos totais.

Para a extração dos lípidos totais foi utilizado o método de extração de gordura em produtos da pesca e de aquacultura, descrito por Bligh & Dyer (1959) e com o procedimento técnico em uso na Unidade U-VPPA do INRB, I.P/L.IPMA.

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Papel de filtro Whattman nº.1, ✓ Balança de precisão 0,001 g, ✓ Copos de vidro, ✓ Funil de Buchner, ✓ Kitasato e adaptador de borracha, ✓ Bomba de vácuo e respetiva mangueira, ✓ Ampola de decantação, com respetivas torneiras e anilhas, ✓ Suporte para ampolas, ✓ Balões-Pêra, ✓ Evaporador rotativo (Buchi 461 water bath) e bomba de vácuo (Buchi V 700), ✓ Polytron Ultra Turrax, ✓ Material de uso corrente em laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clorofórmio puro, ▪ Metanol puro, ▪ Sulfato de sódio anidro puro, ▪ Água ultra pura (sistema Milli-Q Plus Millipore) ▪ Solução de Metanol/Clorofórmio (2:1), ▪ Solução saturada de cloreto de sódio puro.

Para esse efeito pesaram-se 15 g da pasta (amostra homogeneizada) de cada alíquota, devidamente homogeneizada, para um copo de 200 mL e adicionou-se 45 mL da solução arrefecida de Metanol/Clorofórmio (2:1), agitando durante 2 a 7 minutos no Polytron (posição 8, Ultra Turrax). Adicionaram-se mais 6 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio fria, continuando a agitar por mais 5 minutos.

Posteriormente, acrescentaram-se 15 mL de Clorofórmio frio, agitando mais 2 a 5 minutos no Polytron e por fim, mais 15 mL de água milli-Q, agitando durante 5 minutos.

Com o auxílio de um funil Buchner e filtro Whatman nº1, filtrou-se a mistura obtida para um kitasato e, posteriormente, transferiu-se o filtrado para uma ampola de decantação, onde ocorre a separação de duas fases. Recolhe-se a fase inferior (fase orgânica) para um balão em forma de pêra, previamente pesado, filtrando com papel de filtro Whatman nº1 e sulfato de sódio anidro puro, para remover alguma água existente.

Procedeu-se, então, à evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo, com banho a 40 °C e 434 mbar.

No final, pesou-se o balão em forma de pêra e solubilizou-se o óleo num volume de clorofórmio conhecido e armazenou-se no congelador.

2.1.2. Extração dos lípidos no bioacessível.

Como foi descrito anteriormente, para extrair gordura das amostras é utilizado o método de Bligh & Dyer (1959), que tem como solventes o metanol e clorofórmio.

Para as amostras de bioacessível, que resultam do processo de digestão *in vitro*, o método sofre algumas alterações, uma vez que a gordura já se encontra disponível.

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Filtro Macherey-Nalgel Mn 615 ø 150 mm, ✓ Balança de precisão 0,001 g, ✓ Tubos de vidro rolhados, ✓ Frascos de vidro rolhados, ✓ Centrifuga Sigma, 2K 15, ✓ Vórtex Heidolph, ReAX, ✓ Evaporador rotativo (Buchi 461 water bath) e bomba de vácuo (Buchi V 700), ✓ Balões-Pêra, ✓ Material de uso corrente em laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clorofórmio puro, ▪ Sulfato de sódio anidro puro, ▪ Água ultra pura (sistema Milli-Q Plus Millipore)

Dividiu-se a amostra de bioacessível por dois tubos rolhados (cerca de 5 a 6 mL em cada tubo) e, a cada um, adicionaram-se 2 mL de clorofórmio.

Homogeneizou-se durante 1 minuto no vortex e levou-se a centrifugar a 2000 *g* durante 5 minutos e a 4 °C. Recolhe-se a fase superior para um frasco devidamente identificado e rolhado e à fase inferior, que se mantém no tubo, adicionaram-se 2 mL de clorofórmio e 1 mL de água milli-Q, homogeneizando, novamente e voltando a centrifugar sob as mesmas condições. Recolheu-se a fase superior e adicionaram-se mais 2 mL de clorofórmio e 1 mL de água milli-Q à fase inferior e repetiu-se o procedimento de homogeneização e centrifugação, removendo a fase superior.

Verteu-se a fase inferior para um balão em forma de pêra, previamente pesado, filtrando (com filtro Macherey-Nalgel Mn 615 ϕ 150 mm e sulfato de sódio anidro) para remover alguma água presente e procedeu-se à evaporação do clorofórmio em evaporador rotativo, com banho a 40 °C e 434 mbar.

Após evaporação, o balão em forma de pêra foi pesado e solubilizou-se o óleo num volume de clorofórmio conhecido, armazenando-se em congelador.

2.1.3. Separação da fração não polar (TAG's) dos lípidos.

Os diferentes constituintes dos lípidos podem separar-se nas suas frações polares e não polares e para se obter a fração não polar (TAG's), utilizou-se um método seletivo, que recorre ao uso de uma coluna de extração em fase sólida (SPE) de sílica.

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Proveta de 50 mL, ✓ Copos, ✓ Coluna de extração em fase sólida de sílica de 6mL, 500mg (IST ISOLUTE SPE COLUMNS), ✓ Micropipeta de 5 mL, ✓ Balões-Pêra, ✓ Tubos de vidro rolhados, ✓ Evaporador rotativo (Buchi 461 water bath) e bomba de vácuo (Buchi V 700), ✓ Balança de precisão 0,001g (Mettler Toledo, AG 204), ✓ Material de uso corrente. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ n-Hexano > 99,9% (V/V) (Merck), ▪ Éter dietílico > 99,7% (V/V) (Merck), ▪ Clorofórmio puro.

Primeiramente preparou-se uma solução 1:1 de hexano e éter dietílico e condicionou-se a coluna de extração em fase sólida (ISOLUTE SPE COLUMNS 6 mL, 500 mg) com 5 mL da solução preparada.

Depois de condicionada a coluna, adicionaram-se 250 μ L da amostra (50 mg da amostra solubilizada em 250 μ L de *n*-hexano) e recolheu-se a solução resultante para um balão-pêra previamente tarado. Adicionaram-se mais 40 mL da solução 1:1 de hexano: éter dietílico e recolheu-se no mesmo balão-pêra, a solução resultante.

Evaporou-se o solvente em evaporador rotativo, com banho a 40 °C e 285 mbar e, no final, pesou-se novamente o balão. Solubilizou-se a amostra num volume de clorofórmio e transferiu-se para um tubo rolhado de massa conhecida e armazenou-se no frio até determinação do perfil dos ácidos gordos através da técnica descrita em **2.1.5**.

2.1.4. Determinação de classes de lípidos por Cromatografia de camada fina.

Depois da extração dos lípidos totais e da fração bioacessível, pretende-se avaliar quais as classes lipídicas presentes nessas frações. Para tal, utilizou-se a cromatografia de camada fina (TLC) descrita em Bandarra *et al.* (2001) e de acordo com o procedimento técnico em uso na unidade U.VPPA do INRB, I.P/L.IPMA.

Esta técnica consiste, essencialmente, na identificação dos componentes presentes na amostra, através da comparação com padrões (Sigma chemical Co., St. Louis, Mo.) e a sua quantificação é feita, utilizando um *scanner* e software Quantity One da PDI (versão 2.4, USA, New York).

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estufa, ✓ Placas de sílica gel F-254 com 0,25 mm de espessura 20x20, ✓ Exsicador, ✓ Câmara de eluição, ✓ Suporte de TLC com lápis metálico e régua graduada, ✓ Micropipeta de exclusão total, ✓ Pulverizador automático, ✓ Scanner, ✓ Material de uso corrente em laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ n-Hexano > 99,9% (V/V) (Merck), ▪ Éter dietílico > 99,7% (m/m) (Merck), ▪ Ácido fórmico 98-100% (V/V) (Merck), ▪ Padrões de ácidos gordos (TAG, FFA, MAG, CH, PC), ▪ Ácido fosfomobilídico hidratado 10% em etanol (Merck). <p><i>(Todos os reagentes possuem grau analítico para cromatografia e foi utilizada água ultra pura – sistema Milli-Q Plus Millipore.)</i></p>

2.1.4.1. Metodologia de TLC analítica.

Colocou-se a placa na estufa a 110 °C durante 1 hora, para promover a ativação da sílica, deixando arrefecer posteriormente em exsicador à temperatura ambiente.

Entretanto, preparou-se a câmara de eluição, com 2 folhas de papel absorvente sobre as paredes frontal e traseira e a mistura de eluição, composta por n-hexano: éter dietílico: ácido fórmico (50:50:2), colocando-a no interior da câmara para promover a saturação durante cerca de 30 minutos.

Colocou-se a placa no suporte e fez-se uma linha, a cerca de 2 cm do limite superior. De seguida, com o auxílio de uma régua com pequenos fossos, aplicaram-se 10 µL das amostras de gordura inicial, bioacessível e padrão misto (TAG, MAG, DAG, PC), na concentração de 12 mg/mL em clorofórmio, com uma micropipeta de exclusão total, como representa o esquema da **figura 9**.

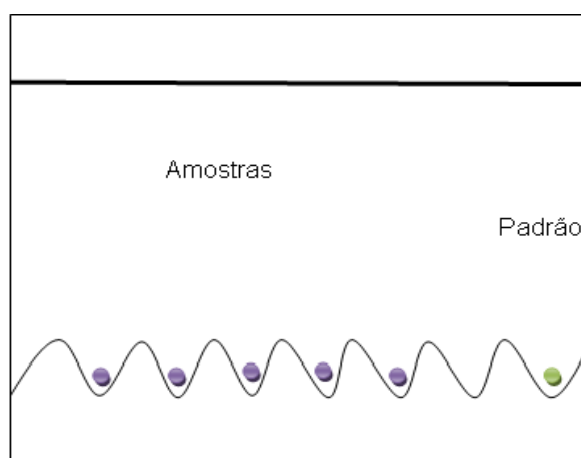


Figura 9: Esquema representativo do riscado e pontos de aplicação na placa de TLC analítica.

Colocou-se a placa na câmara de eluição, deixando o solvente eluir até ao risco superior da placa. Quando concluída a eluição retirou-se a placa da câmara e, com a ajuda do pulverizador automático, pulverizou-se a placa com uma solução de ácido fosfomobilídico a 10% em etanol. De seguida, colocou-se a placa na estufa a 120 °C onde permaneceu cerca de 1 hora para a revelação dos constituintes das respetivas frações.

Quando revelada, digitalizou-se para identificação da percentagem relativa dos diferentes constituintes, através do programa Quantity One da PDI (versão 2.4, USA, New York).

2.1.4.2. Técnica TLC preparativa

A anteriormente referida, TLC analítica, permite identificar e quantificar em termos relativos as diferentes classes lipídicas, enquanto a TLC preparativa, por sua vez, permite conhecer o perfil de ácidos gordos de cada classe lipídica presente na amostra.

A determinação das classes de lípidos foi feita por cromatografia em camada preparativa, de acordo com o método referenciado em Bandarra *et al.* (2001) e com o procedimento técnico utilizado na Unidade U-VPPA do INRB, I.P/L.IPMA.

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estufa, ✓ Placas de sílica gel F-254 com 2 mm de espessura 20×20 com indicador de fluorescência para revelação por luz ultravioleta, ✓ Exsicador, ✓ Câmara de eluição, ✓ Papel absorvente, ✓ Suporte de TLC com lápis metálico e régua graduada, ✓ Micropipeta de exclusão total, ✓ Pulverizador automático, ✓ Câmara de luz UV, ✓ Tubos 18 de pirex rolhados, ✓ Papel de alumínio, ✓ Espátula, ✓ Funil, ✓ Material de uso corrente em laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ n-Hexano > 99,9% (V/V) (Merck), ▪ Éter dietílico > 99,7% (V/V) (Merck), ▪ Ácido fórmico 98-100% (V/V) (Merck), ▪ Padrões de ácidos gordos (TAG, FFA, MAG, CH, PC), ▪ Solução de 0,2% de 2',7'-diclorofluoresceína em etanol (Merck). <p><i>(Todos os reagentes possuem grau analítico para cromatografia e foi utilizada água ultra pura – sistema Milli-Q Plus Millipore.)</i></p>

A técnica usada na cromatografia preparativa é muito semelhante à técnica analítica, diferindo apenas na espessura das placas de sílica utilizadas e por consequência, no tempo e temperatura que esta permanece na estufa. A solução de pulverização também é diferente, assim como o método de revelação dos constituintes.

a) Eluição: Primeiro, colocou-se a placa na estufa a 110 °C, durante 1 hora para a ativar, deixando arrefecer em exsicador à temperatura ambiente.

Entretanto, preparou-se a solução de eluição, idêntica à referida no método anterior, e deixou-se saturar o ambiente dentro da câmara de eluição. Enquanto isso, fez-se o riscado na placa de sílica:

- Um risco horizontal, a cerca de 2 cm do limite superior, a fim de evitar que a amostra elua até ao limite superior da placa,

- Um risco, a cerca de 4 cm do limite direito da placa, separando assim, a área de eluição do padrão da área de eluição da amostra (**Figura 10**).

De seguida aplicaram-se 25 µL do padrão e da gordura inicial ou bioacessível, diluída em clorofórmio e com concentrações de 25 mg/mL, para a corvina e de 50 mg/mL para o Salmão e colocou-se a placa na câmara de eluição.

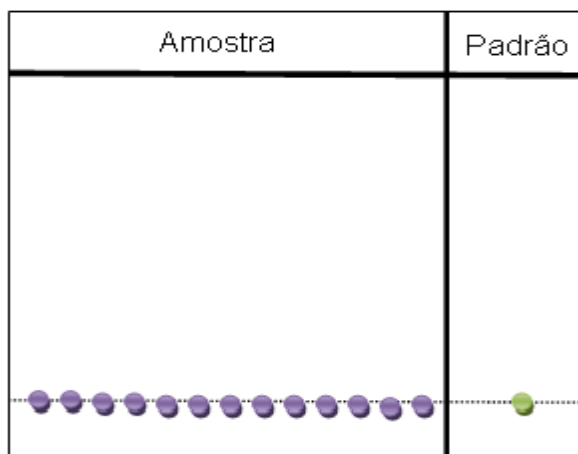


Figura 10: Esquema representativo do riscado e pontos de aplicação da TLC preparativa.

Quando finalizada a eluição, pulverizou-se a placa com uma solução de 0,2 % de 2',7'-diclorofluoresceína em etano, que depois de seca, foi visualizada na câmara de luz UV, assinalando-se as manchas correspondentes às frações, identificadas por comparação com os tempos de retenção dos padrões sigma, analisados nas mesmas condições que a amostra.

b) Extração e análise do perfil de ácidos gordos: Com a ajuda do lápis metálico e de uma espátula, raspou-se cada uma das frações assinaladas anteriormente, com base no padrão (testemunho), e esmagou-se até formar um pó homogéneo que se colocou em tubos, devidamente identificados com a fração correspondente, tendo em atenção que não deveriam ficar muito cheios para permitir a realização da reação de preparação dos ésteres metílicos.

2.1.5. Determinação do perfil de ácidos gordos.

O perfil de ácidos gordos é determinado de acordo com o método descrito por Lepage e Roy (1986), modificado por Cohen *et al.* (1988) e respeitando o procedimento técnico em uso na Unidade U-VPPA do INRB, I:P/L:IPMA.

Este método consiste na transesterificação dos ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME – Fatty Acid Methyl Esters) através de catálise ácida das frações raspadas da TLC preparativa e da fração não polar (TAG's) obtida por extração em fase sólida (SPE) de sílica.

Material	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vortex (Heidolph, ReAX), ✓ Banho termostatzado (Reacti, Therm III), ✓ Centrífuga (Sigma, 2K 15), ✓ Algodão, ✓ Pontas de micropipeta de 5 mL, ✓ Frascos para injeção (Viais), ✓ Insert's ✓ Cromatografo de fase gasosa (Varian, CP-3800) equipado com um amostrador automático e um detetor de ionização de chama, ✓ Material de uso corrente em laboratório. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ n-Heptano > 99,3% (V/V) (Merck), ▪ Cloreto de acetilo para síntese > 98% (V/V) (Merck), ▪ Metanol 99,8% (V/V) (Merck), ▪ Água ultra pura (sistema Milli-Q Plus Millipore), ▪ Sulfato de sódio anidro 99,9% (m/m) (Panreac).

a) Preparação da solução de Cloreto de Acetilo: Metanol a 5% (1:19): Tendo em conta que se trata de uma reação exotérmica, esta solução foi preparada na hotte e com o copo dentro de uma tina com gelo. Primeiramente adicionou-se o metanol no copo e depois, com uma pipeta de Pasteur, adicionaram-se gotas, pelas paredes do copo, de cloreto de acetilo.

b) Extração: A cada tubo, onde se encontra o pó extraído das diferentes frações da TLC preparativa e os TAG extraídos por coluna de sílica (2.1.3.), adicionaram-se 5 mL da solução metanólica de cloreto de acetilo a 5 %. Agitaram-se os tubos no vortex, durante 30 segundos e colocam-se em banho-maria a 80 °C por uma hora. Após o banho, nos tubos em que ocorreu a evaporação total do solvente, adicionaram-se 5 mL de Metanol.

A cada tubo, adicionou-se 1 mL de água milli-Q e 2 mL de n-heptano, agitando mais 30 segundos no vortex para depois centrifugar a 2000-2300 g, durante 5 minutos a 4 °C.

Faz-se a recolha da fase orgânica (superior), onde se encontram os ésteres metílicos, para um vial, filtrando através de uma coluna de algodão com sulfato de sódio anidro.

Com o auxílio de um evaporador de amostras (em corrente de azoto), evaporou-se todo o solvente do vial e transferiu-se a amostra para um vial com insert, adicionando 200 µL de *n*-heptano, no caso do salmão e 100 µL no caso da corvina.

c) Análise cromatográfica: A análise dos ésteres metílicos dos ácidos gordos foi efetuada pela injeção de 2 µL num cromatógrafo de fase gasosa, Varian CP-3800 com detetor de ionização de chama (FID). A separação é efetuada numa coluna capilar de sílica fundida OMEGAWAX (0,25 mm d.i × 30 m × 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste.

O método de análise tem a duração de 40 minutos por cada injeção, sendo que, durante esse tempo, a coluna é aquecida a 180 °C, aumentando cerca de 4 °C durante 25 minutos, até se atingir os 220 °C.

Deste processo, obtêm-se cromatogramas que fornecem a percentagem relativa de cada ácido gordo presente na amostra (% AG) por comparação da área do ácido gordo com a área do padrão previamente identificado, e posteriormente, entre a área de cada ácido (A_{ag}) e a área total (A_{total}) dos ácidos gordos na amostra.

$$\% \text{ AG} = (A_{ag} \times 100) / A_{total}$$

No caso dos ácidos minoritários, não disponíveis em padrões, recorreu-se ao cálculo do comprimento equivalente da cadeia (Equivalent Chain Length - ECL).

No entanto, pretende-se representar os resultados em valor absoluto, mais propriamente, em mg/100 g de parte edível e para isso recorre-se a um fator corretivo, calculado de acordo com Weihrauch *et al.* (1977), que varia de acordo com a espécie de peixe e, por consequência, de acordo com o teor de gordura presente na amostra. Este fator depende, também, da classe lipídica em que os ácidos gordos se encontram na sua maioria.

Assim, foram calculados quatro fatores, um para a corvina inicial (crua e grelhada), outro para corvina bioacessível (crua e grelhada), um outro para o salmão inicial (cru e grelhado) e por fim, um para o salmão bioacessível (cru e grelhado).

Após o cálculo destes fatores, os seus valores são aplicados da seguinte forma:

$$AG \times F \times G \times 1000$$

Sendo:

AG – Ácido gordo em % (retirado do cromatograma),

F – Fator conversão,

G - % de gordura na amostra inicial, expressa em g de gordura/ 100 g de parte edível.

Os resultados assim obtidos são expressos em mg/100 g de parte edível na amostra inicial ou no bioacessível.

Estes valores são arredondados às centésimas e é feito o cálculo da percentagem de bioacessibilidade de cada ácido gordo, nas frações estudadas e analisadas, utilizando a fórmula a seguir apresentada:

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \left(\frac{\text{mg deAG}/100\text{g (bioacessível)}}{\text{mg deAG}/100\text{g (amostra inicial)}} \right) \times 100$$

3. Resultados.

3.1. Salmão.

3.1.1. Identificação e quantificação das classes lipídicas.

Para a identificação e quantificação das diferentes classes lipídicas presentes no salmão cru, grelhado e nos respectivos bioacessíveis, recorreu-se à análise das TLC analíticas, apresentada na **figura 11**.

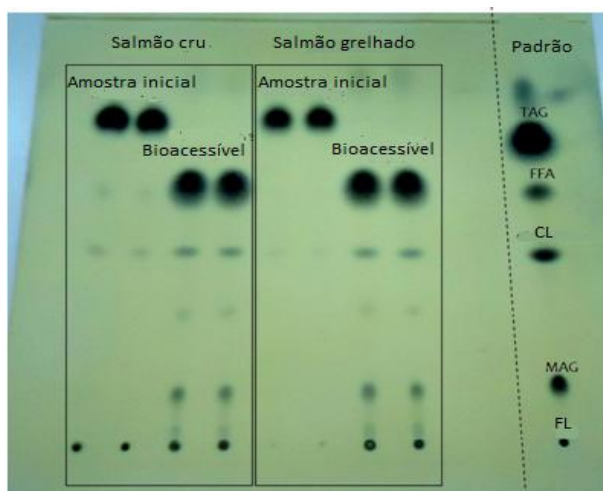


Figura 11: TLC analítica do salmão cru e grelhado com os respectivos bioacessíveis.

Com o auxílio do programa Quantity One da PDI (versão 2.4, USA, New York), identificaram-se as percentagens relativas de cada uma das classes presentes na fração inicial e bioacessível do salmão cru e grelhado (**Figura 12 e 13**).

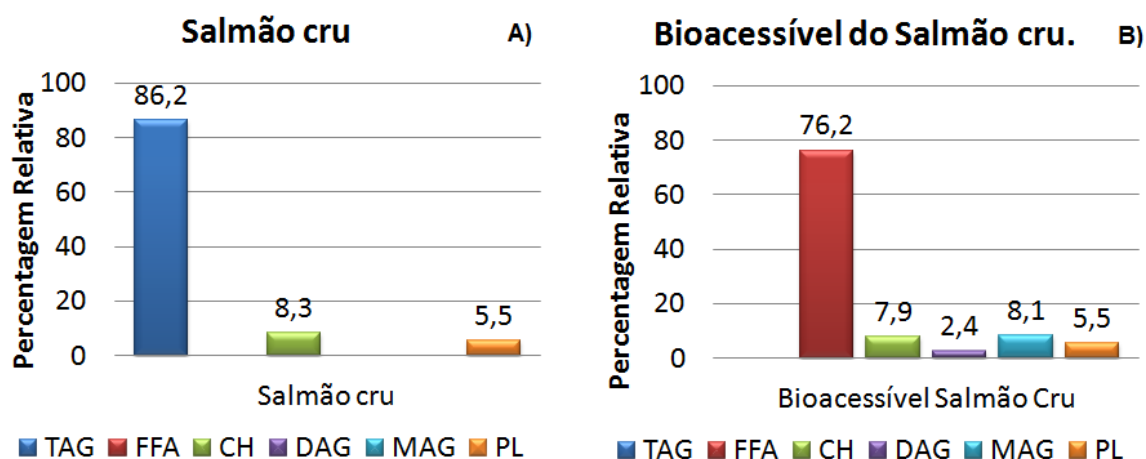


Figura 12: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas no salmão cru A) e no bioacessível do salmão cru B).

É possível verificar que as classes dominantes na fração inicial são os TAG, o CH e os PL, enquanto na fração bioacessível a classe mais representativa é a dos FFA, uma vez que ocorreu a hidrólise completa dos triacilgliceróis e a formação de ácidos gordos livres e alguns mono- e diacilgliceróis, refletindo a eficiência do modelo digestivo aplicado.

Contrariamente ao que consta na bibliografia, a fração de fosfolípidos não sofreu qualquer alteração, o que se pode justificar pelo facto do salmão ser um peixe gordo, muito rico em lípidos de reserva que são mais facilmente afetados que os lípidos estruturais (PL).

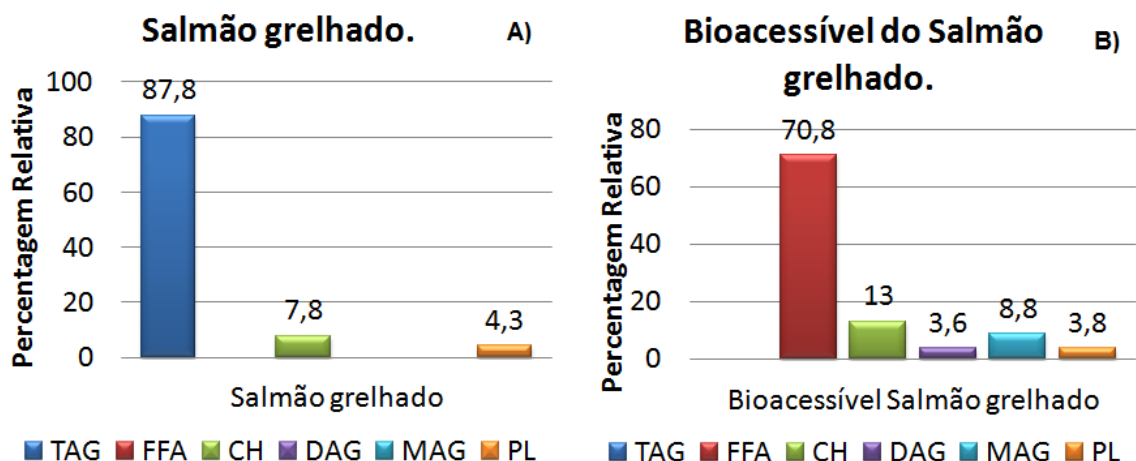


Figura 13: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas no salmão grelhado A) e respetivo bioacessível B).

Quanto ao salmão grelhado é observado um aumento da percentagem relativa de cada uma das classes, provavelmente devido à perda de humidade durante o processamento culinário. No entanto, as classes dominantes em cada uma das frações mantêm-se, verificando-se a hidrólise total dos TAG com formação de ácidos gordos livres e alguns

mono- e diacilgliceróis, o que mais uma vez, suporta a teoria de que o modelo digestivo aplicado é eficiente.

Em relação aos PL, estes sofrem uma hidrólise de 12,3%, calculada através da fórmula:

$$\% \text{ Hidrólise} = \frac{(\% \text{ relativa inicial} - \% \text{ relativa Bioacessível})}{\% \text{ relativa inicial}} \times 100$$

Comparando com o salmão cru, onde os fosfolípidos não sofrem hidrólise, este resultado indica que o tratamento culinário a que o peixe foi sujeito, vem facilitar o acesso aos lípidos mais estruturais.

3.1.3. Composição química do salmão cru e grelhado

Para que melhor se entendam as alterações que os tratamentos culinários provocam, ao nível dos ácidos gordos do pescado, é necessário conhecer as modificações que ocorrem na sua composição química. Para isso, foram determinados os teores de humidade, proteína, lípidos totais e cinza no salmão cru e depois de grelhado (**tabela 5**), utilizando as metodologias descritas no **anexo II**, uma vez que estes dados foram fornecidos pelo IPMA, no âmbito do projeto GOODFISH.

Tabela 5: Composição química do Salmão cru e grelhado.

Macronutrientes	Salmão Cru (g/100 g)	Salmão Grelhado (g/100 g)
Humidade	59,24	50,89
Proteína	19,11	22,64
Lípidos (Soxhlet)*	19,88	24,15
Cinza	0,95	2,98

* Metodologia mais adequada a espécies com elevado teor lipídico.

Com o tratamento culinário há uma redução do teor de humidade do peixe e, por consequência, os outros constituintes ficam mais concentrados.

3.1.4. Determinação do perfil de ácidos gordos do salmão e a influência do tratamento culinário.

Sabendo que a classe lipídica dominante na fração inicial do salmão cru e grelhado é a classe dos triacilgliceróis, é importante saber qual a sua composição em ácidos gordos (os mais importantes) e analisar a influência que o tratamento culinário tem nessa composição.

Assim, fez-se a análise cromatográfica dos FAME obtidos a partir das TLC's preparativas apresentadas nas **figuras 14 e 15**.

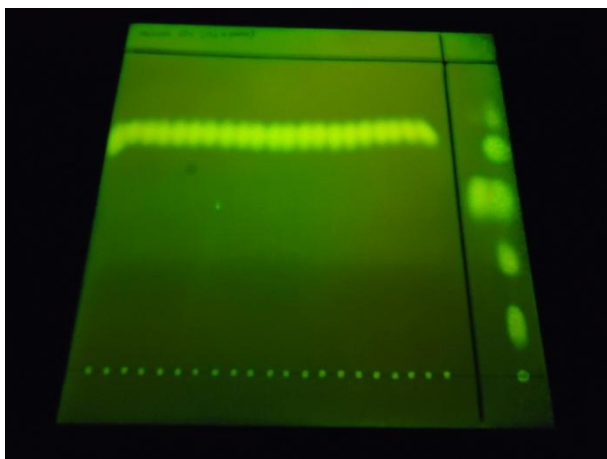


Figura 14: TLC preparativa do salmão cru.

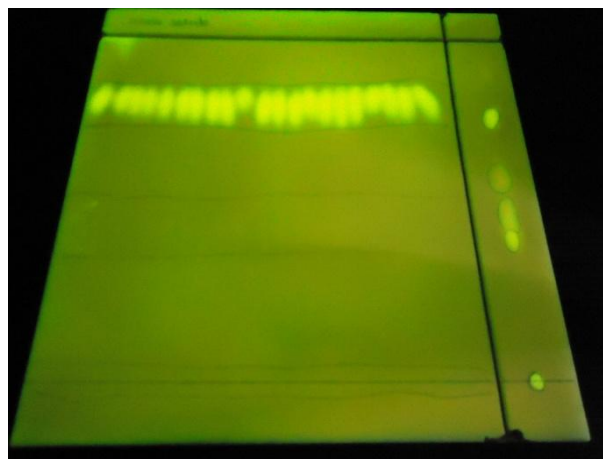


Figura 15: TLC preparativa do salmão grelhado.

Daqui resultaram os cromatogramas em **anexo III e IV**, onde foram identificadas as percentagens relativas de cada ácido gordo, a partir das quais, se obtiveram os valores em mg/100 g apresentados no **anexo V**, respetivamente com a determinação do fator de conversão e da percentagem de gordura.

Na **figura 16** está representada a composição em ácidos gordos, da fração inicial do salmão cru e grelhado, de acordo com o grau de saturação e da sua configuração ómega-3 e ómega-6 e, por fim, a composição em EPA e DHA.

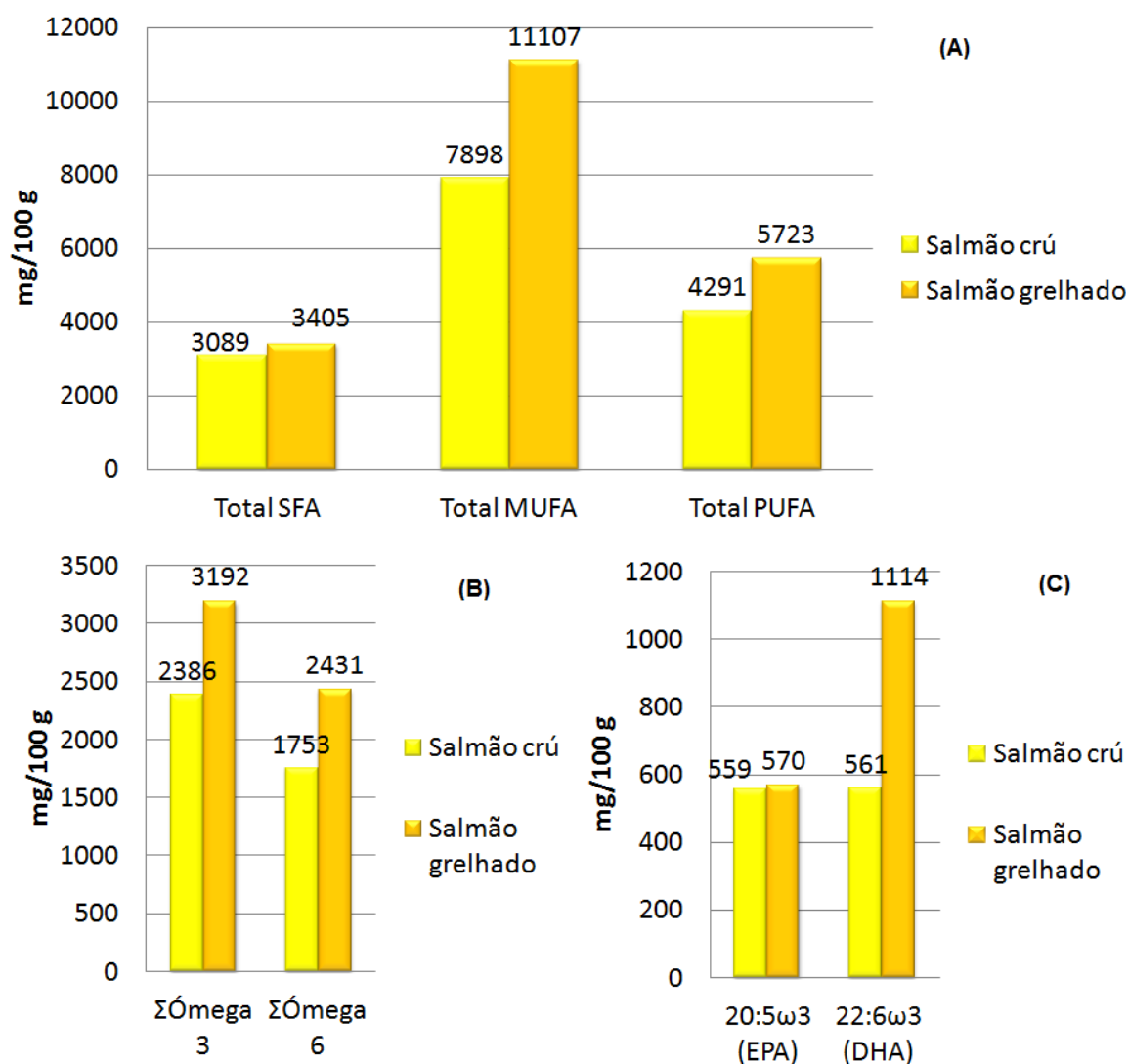


Figura 16: Composição em ácidos gordos da fração inicial do salmão cru e grelhado de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e, composição em EPA e DHA (C).

Comparando o salmão cru com o salmão grelhado é possível verificar que o tratamento culinário leva à concentração dos ácidos gordos, dada a perda de água anteriormente registada.

Os ácidos gordos presentes em maiores quantidades, tanto no salmão cru como no grelhado, são os monoinsaturados, onde o ácido oleico (18:1) é o mais representativo. Seguem-se os PUFA, com 4291 mg/100 g de parte edível, sendo o ácido linoleico (LA) aquele que está presente em maior quantidade. Por fim, estão os ácidos gordos saturados, presentes em menor quantidade, com o ácido palmítico a ser o mais dominante.

Esta relação mantém-se após o tratamento culinário, mas com valores superiores.

3.1.5. Determinação da bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão cru e no salmão grelhado.

Também para a determinação da bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão cru e grelhado, foi feita a análise cromatográfica dos FAME obtidos a partir das TLC's preparativas apresentadas nas **figuras 17 e 18**.

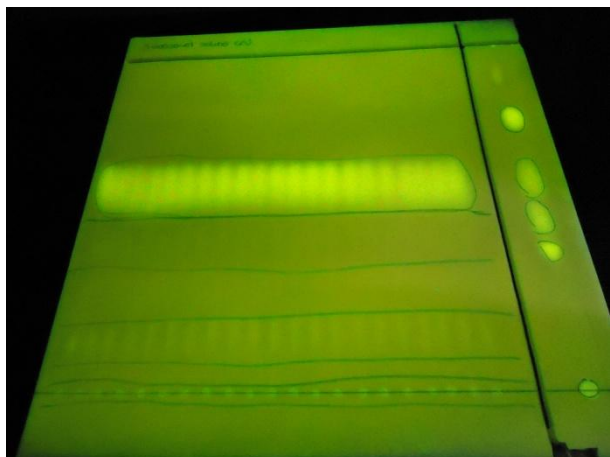


Figura 17: TLC preparativa do bioacessível do salmão cru.

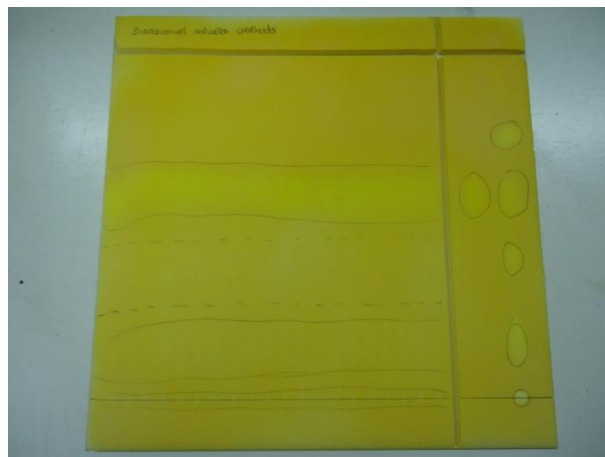


Figura 18: TLC preparativa do bioacessível do salmão grelhado.

Desta análise cromatográfica resultaram os cromatogramas apresentados nos **anexos VI e VII**, onde foram identificadas as percentagens de cada ácido gordo presente na amostra. No entanto, com o avançar deste estudo, foi detetado um incremento de gordura durante o ensaio de bioacessibilidade, uma vez que a solução de enzimas adicionada também tem gordura na sua composição. Assim, antes de serem efetuados os cálculos para a obtenção dos ácidos gordos em valor absoluto (mg/100 g), foi estudado o perfil de ácidos gordos da solução de enzimas (**anexo VIII**) e foram feitos cálculos para ajustar os teores de gordura nas amostras de bioacessível (**anexo IX**).

Depois destes ajustes, e do cálculo do fator de conversão para estas amostras, foram obtidos os valores apresentados no **anexo X**. A partir destes foi calculada a percentagem de bioacessibilidade, para cada um dos ácidos gordos, através da fórmula a seguir apresentada:

$$\% \text{ Bioacessibilidade} = \frac{\text{massa do Ác. gordo no bioacessível (mg)}}{\text{massa do Ác. gordo na amostra inicial (mg)}} \times 100$$

Com base nestas percentagens, obtiveram-se os gráficos das **figuras 19 e 20**.

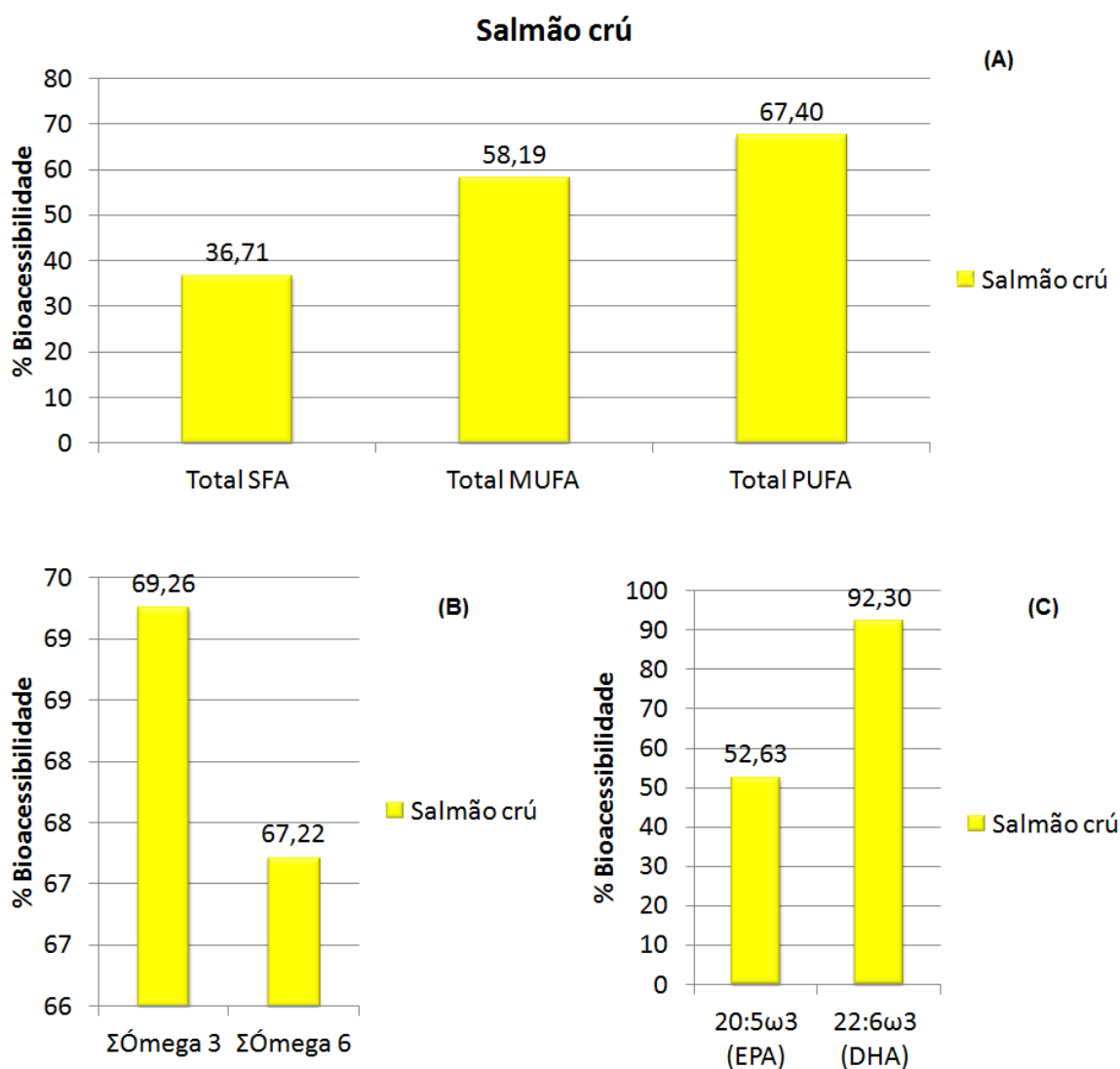


Figura 19: Percentagem de Bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão cru, de acordo com o nível de saturação (A), configuração ómega-3 e ómega-6 (B) e, percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).

Ao analisar as percentagens de bioacessibilidade no salmão cru, verifica-se que os ácidos gordos que são mais facilmente libertados da matriz alimentar são os PUFA com 67,40% de bioacessibilidade em detrimento dos ácidos gordos saturados, com apenas 36,71%.

Dentro dos ácidos gordos polinsaturados, os ómega-3 e os ómega-6 têm percentagens de bioacessibilidade muito próximas, embora sejam os ácidos gordos ómega-3 os mais bioacessíveis, contribuindo para isso a percentagem de 92,30% do DHA.

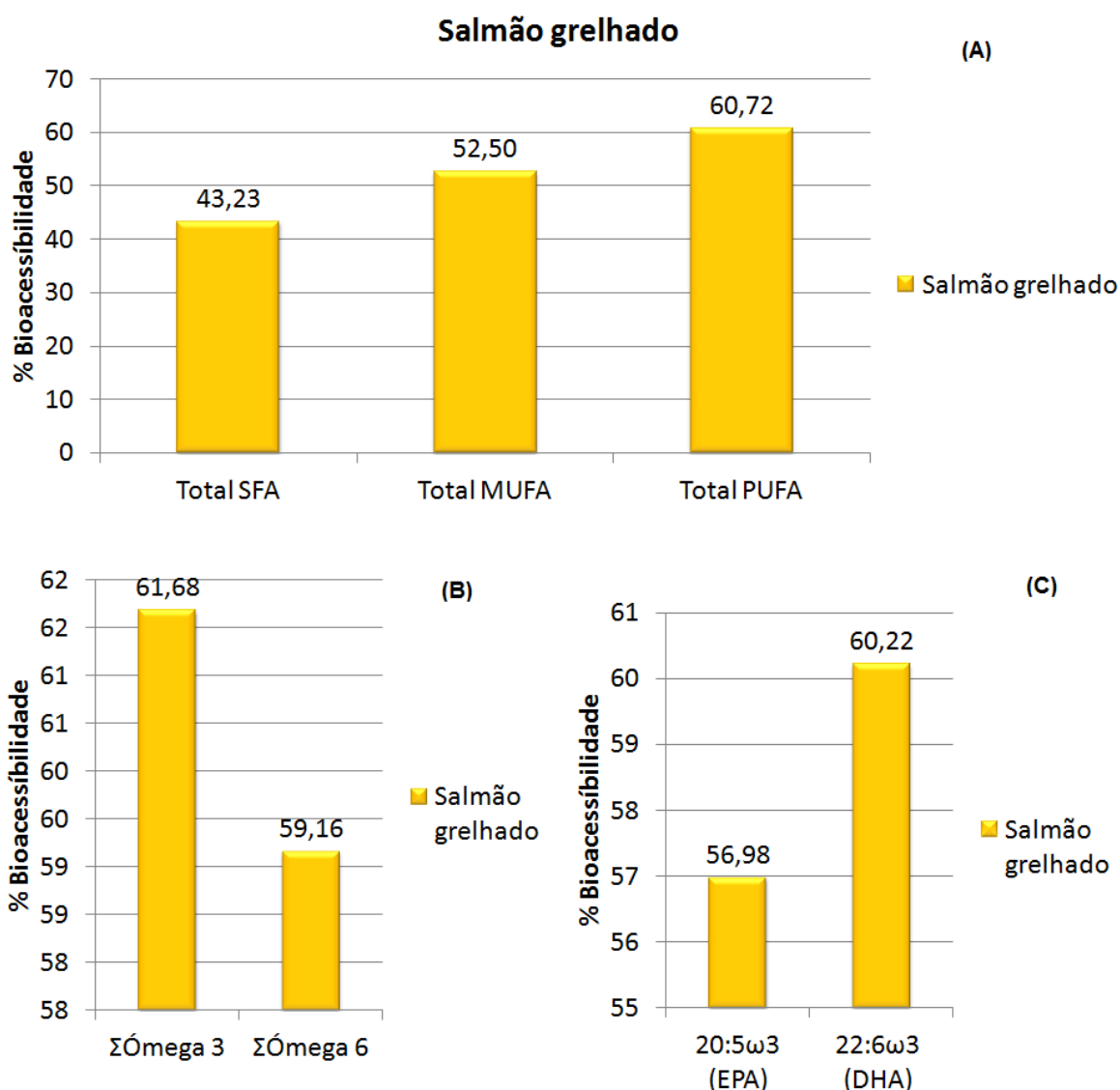


Figura 20: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos no salmão grelhado de acordo com o nível de saturação (A), configuração ómega-3 e ómega-6 (B) e percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).

No salmão grelhado, continuam a ser os PUFA os mais bioacessíveis, com uma percentagem de 60,72%, em detrimento dos 43,23% dos ácidos gordos saturados.

Dentro dos PUFA, são os ácidos gordos ómega-3 que têm uma percentagem de bioacessibilidade mais elevada, sendo que para isso muito contribui a bioacessibilidade do EPA (56,98%) e do DHA (60,22%).

3.2. Corvina

O fato de se ter analisado o comportamento do salmão, um peixe gordo, quando exposto ao tratamento culinário, grelhar, e de se ter averiguado o seu perfil lipídico e a

bioacessibilidade dos seus ácidos gordos, não nos garante que outras espécies de pescado, com um teor lipídico diferente, se comportem do mesmo modo.

Assim, pretendeu-se completar este estudo, analisando a corvina, uma espécie com um baixo teor lipídico, funcionando assim, como um outro modelo, mas para peixes, ditos, magros.

3.2.1. Identificação e quantificação das classes lipídicas.

Assim, como para o salmão, recorreu-se à análise das TLC's analíticas, apresentadas nas **figuras 21 e 22**, para identificar e quantificar as diferentes classes lipídicas presentes na Corvina crua, grelhada e respetivos bioacessíveis.

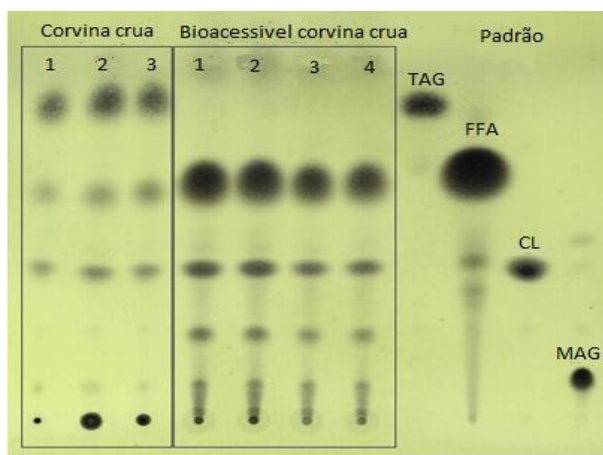


Figura 21: TLC analítica da corvina crua e respetivo bioacessível.

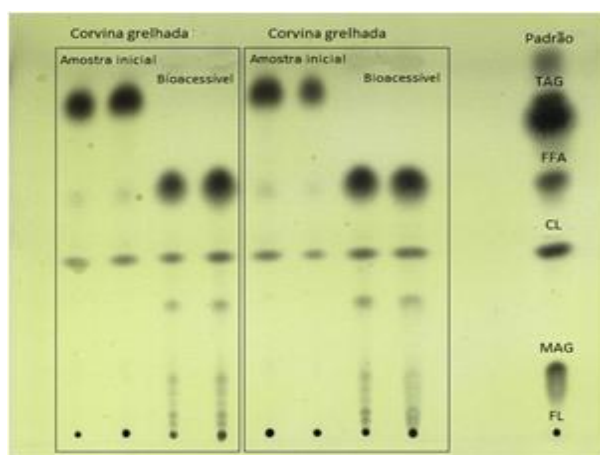


Figura 22: TLC analítica da corvina grelhada e respetivo bioacessível.

Com o auxílio do programa Quantity One da PDI (versão 2.4, USA, New York), identificaram-se as percentagens relativas (**figuras 23 e 24**) correspondentes a cada uma das classes.

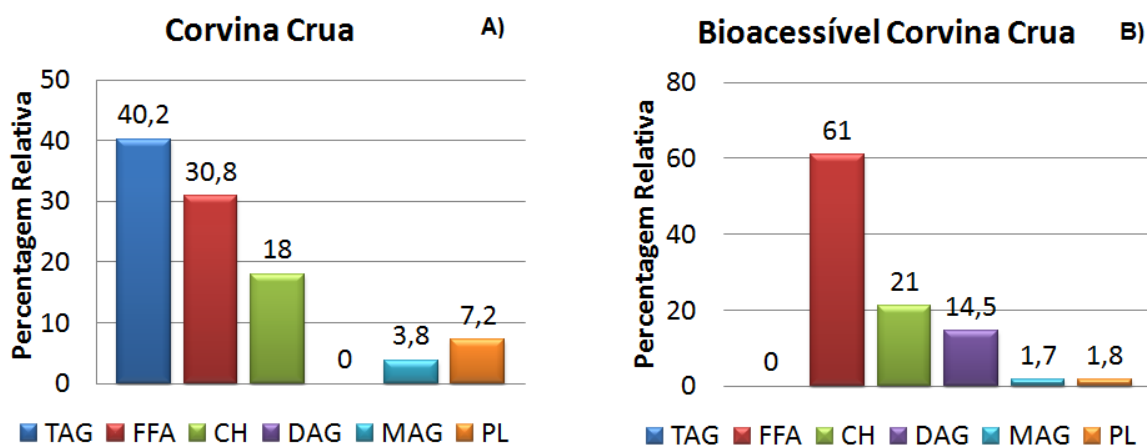


Figura 23: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas na corvina crua (A) e no respetivo bioacessível (B).

A corvina apresenta classes lipídicas menos representativas que as do salmão, o que era expectável dado se tratar de um peixe magro. No entanto, assim como no salmão cru, também na corvina crua a classe dominante na fração inicial é a dos TAG, havendo, contudo, uma elevada percentagem de ácidos gordos livres e de fosfolípidos.

Já na fração bioacessível, a classe mais representativa é a dos FFA, dada a hidrólise completa dos TAG, ocorrendo também uma hidrólise de 74% dos PL presentes na fração inicial, o que traduz um modelo digestivo eficiente.

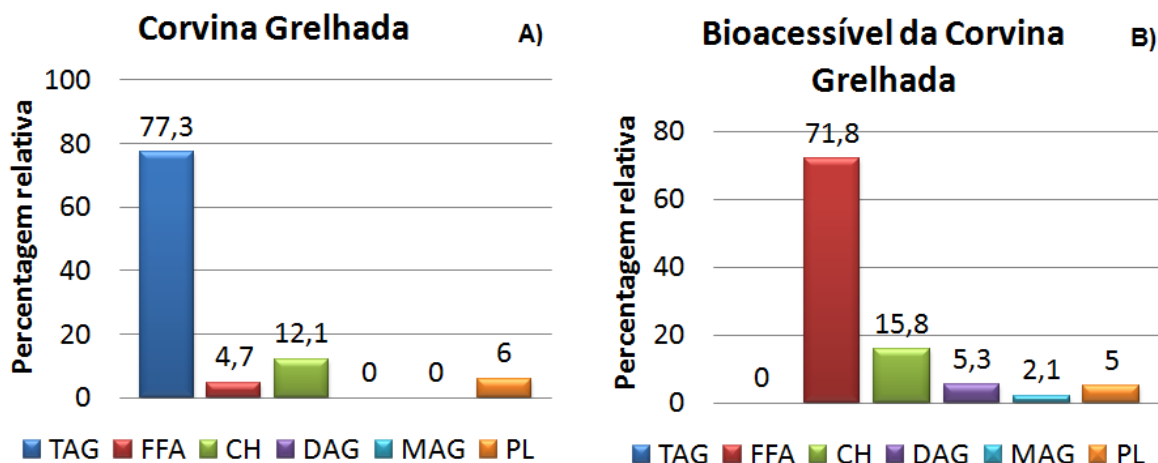


Figura 24: Percentagem relativa das diferentes classes lipídicas na corvina grelhada (A) e no bioacessível da corvina grelhada (B).

Na corvina grelhada verifica-se que o tratamento culinário promove um aumento da percentagem relativa de TAG na amostra inicial, o que se explica pela perda de humidade e, conseqüente, concentração lipídica. No entanto, todas as outras classes sofrem uma redução percentual.

Quanto à fração bioacessível, é visível que a classe dominante é a dos FFA, resultando da hidrólise completa dos TAG e levando à formação de alguns mono- e diacilgliceróis, o que se traduz num modelo digestivo eficiente. No entanto, era expectável que a taxa de hidrólise, relativamente aos fosfolípidos (16%) fosse superior, mas contrariamente ao salmão, parece que o tratamento culinário não favorece a hidrólise desta classe lipídica.

3.2.3. Composição química da corvina crua e grelhada.

Para melhor se entender as alterações que o tratamento culinário pode provocar ao nível dos ácidos gordos da corvina, fez-se o estudo das modificações que o processo de grelhar induz na composição química da mesma.

Assim, utilizando as metodologias descritas no **anexo II** e a técnica de smedes (**anexo XI**) foram determinados os teores de humidade, proteína, lípidos totais e cinza, apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6: Composição química da Corvina crua e grelhada.

Macronutrientes	Corvina Crua (g/100 g)	Corvina Grelhada (g/100 g)
Humidade	76,24	67,20
Proteína	22,15	27,94
Lípidos (Smedes)	1,53	2,59
Cinza	1,29	2,74

* Estes dados foram fornecidos pelo IPMA, no âmbito do projeto GOODFISH.

Assim, podemos verificar que, tal como no salmão, há uma redução do teor de humidade e a consequente concentração dos restantes constituintes do peixe.

3.2.4. Determinação do perfil de ácidos gordos da corvina e a influência do tratamento culinário.

Depois de se saber quais as classes dominantes na fração inicial da corvina, o interesse recai na sua composição em ácidos gordos e na influência que o tratamento culinário tem sobre a mesma.

Assim, fez-se a análise cromatográfica dos FAME obtidos a partir das TLC's preparativas apresentadas nas **figuras 25 e 26**.



Figura 25: TLC preparativa da corvina crua.

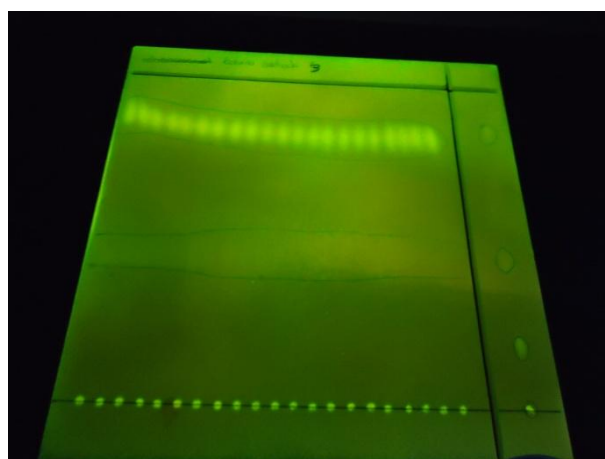


Figura 26: TLC preparativa da corvina grelhada.

Desta análise resultaram os cromatogramas apresentados nos **anexos XII e XIII**, onde foram identificadas as percentagens relativas de cada ácido gordo.

A partir dessas percentagens foram obtidos os valores absolutos (mg/ 100 g) (**figura 27**), entrando em conta com o fator de conversão, previamente calculado, e com a percentagem de gordura presente na amostra, como é apresentado no **anexo XIV**.

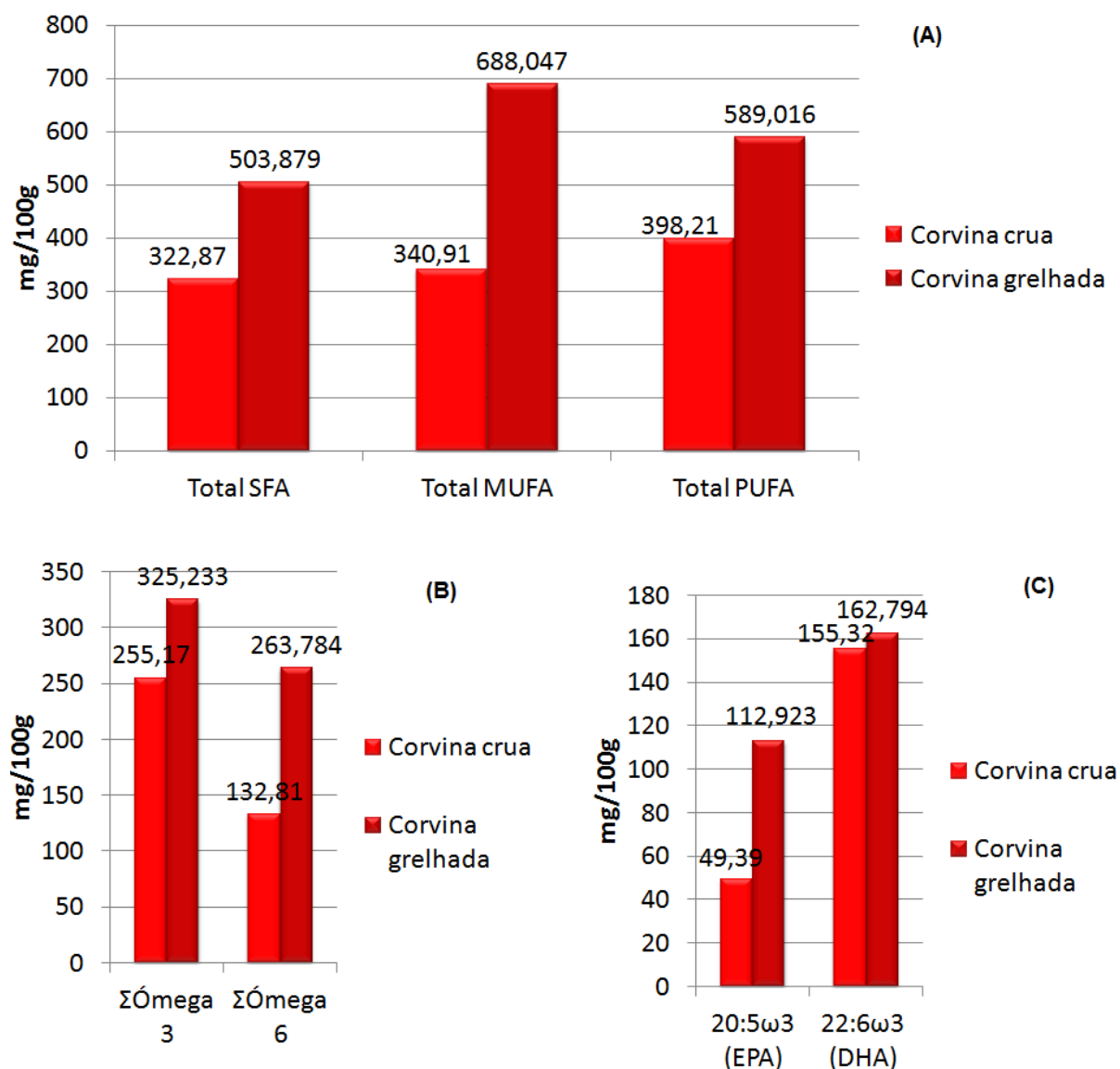


Figura 27: Composição em ácidos gordos, da fração inicial da corvina crua e grelhada, de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e composição em EPA e DHA (C).

Daqui podemos verificar que os valores de ácidos gordos na corvina são inferiores aos do salmão. No entanto, a tendência da concentração de valores com o tratamento culinário, mantem-se.

Ao contrário do salmão, a corvina apresenta uma distribuição muito homogênea dos seus ácidos gordos, de acordo com o grau de saturação, apesar do ácido Palmítico, o ácido oleico e o DHA apresentarem uma concentração mais elevada.

No entanto, o efeito do tratamento culinário não se reflete da mesma forma em todos os ácidos gordos. No caso do EPA este quase que duplica enquanto o DHA sofre apenas um ligeiro aumento, exatamente o contrário do verificado no salmão.

3.2.5. Determinação da bioacessibilidade dos ácidos gordos na corvina crua e na corvina grelhada.

Para quantificar e avaliar a bioacessibilidade de cada ácido gordo, na corvina crua e na corvina grelhada, fez-se a análise cromatográfica dos FAME obtidos a partir das TLC's preparativas (**figuras 28 e 29**) dos bioacessíveis de cada uma.



Figura 28: TLC preparativa do bioacessível da corvina crua.

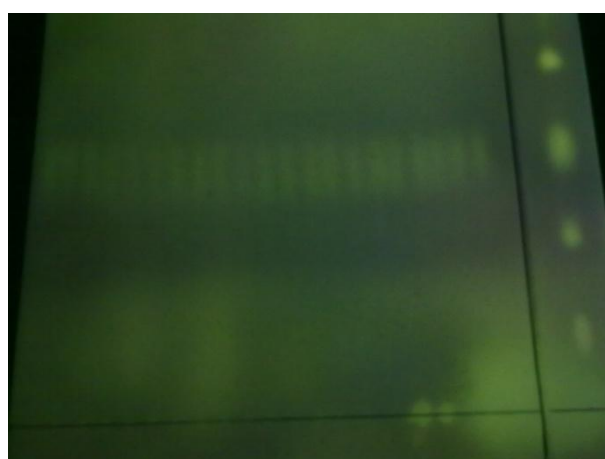


Figura 29: TLC preparativa do bioacessível da corvina grelhada.

Desta análise, resultaram os cromatogramas apresentados nos **anexos XV e XVI**, onde se identificaram os ácidos gordos presentes e a sua percentagem relativa à área total. A partir desta percentagem e entrando em conta com a percentagem de gordura ajustada da amostra (**anexo XVII**) e com o fator de conversão, previamente calculado (**anexo XVIII**), obteve-se o valor de ácidos gordos em mg/100 g. No final, calculou-se a percentagem de bioacessibilidade de cada um, em cada um dos tratamentos culinário (**figuras 30 e 31**).

No entanto, para chegar a estes resultados também foi feito um ajuste dos teores de gordura nas amostras de bioacessível, dado o incremento da solução de enzimas (**anexo VIII**) adicionada no ensaio de bioacessibilidade.

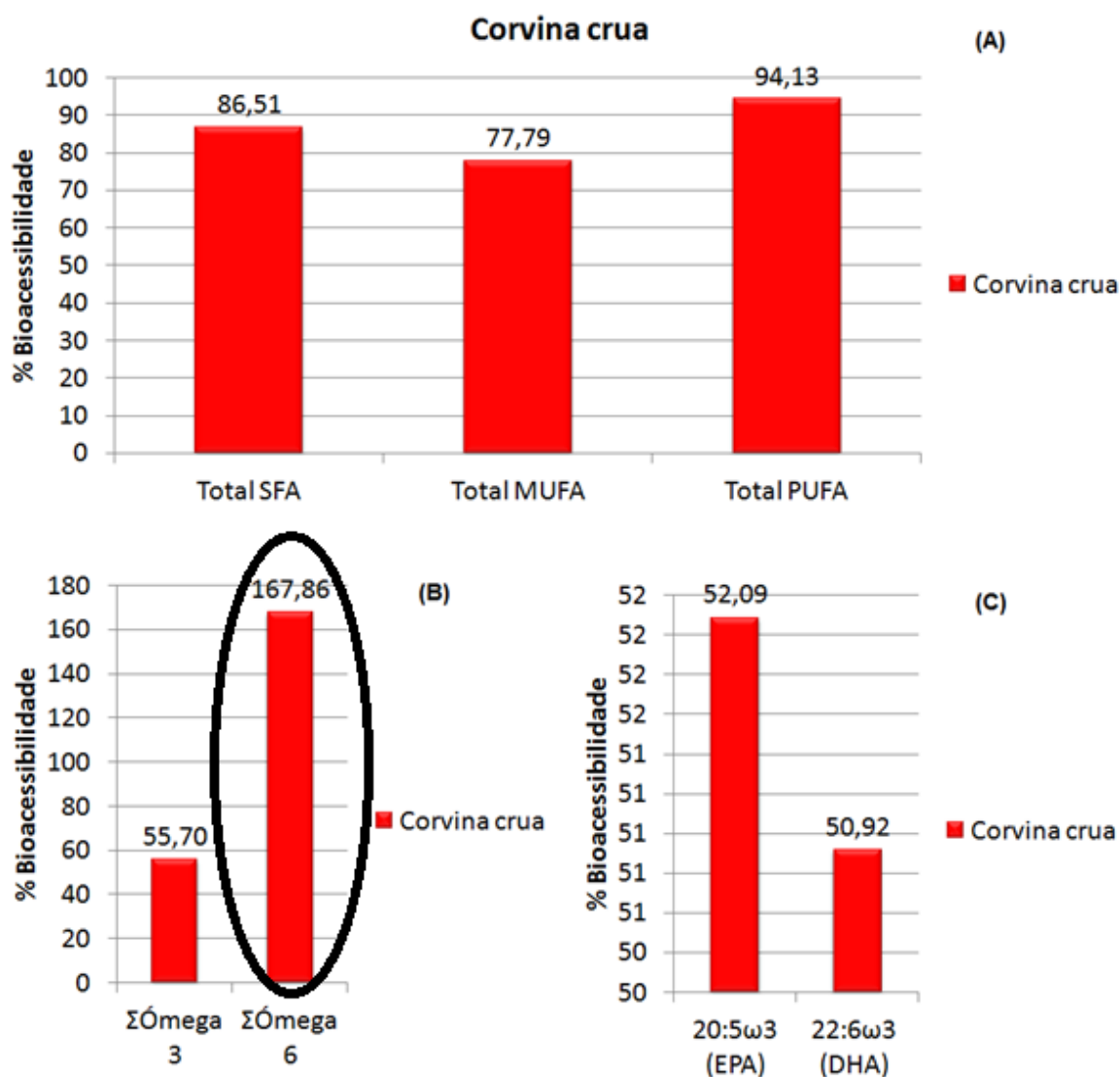


Figura 30: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos da corvina crua de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e, percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).

Analisando a **figura 30** podemos ver que, na sua maioria, a quantidade de ácidos gordos que fica disponível para ser assimilada pelo organismo é menor do que aquela que o alimento contém, à exceção do ácido esteárico, do ácido oleico e do ácido linoleico, que são os ácidos gordos em maior quantidade na solução de enzimas adicionada no ensaio de bioacessibilidade.

Apesar de a percentagem de gordura da amostra ter sido ajustada, para que o incremento lipídico não interferisse com os cálculos em valor absoluto, na corvina esse ajuste não foi suficiente, uma vez que se trata de uma espécie magra, onde qualquer pequena variação tem um peso maior.

Contudo, a distribuição dos restantes ácidos gordos parece ser, mais ou menos homogênea.

Os ácidos gordos mais bioacessíveis são os PUFA, embora o ácido palmítico seja aquele que fica mais disponível para ser absorvido pelo organismo humano. Dentro dos PUFA, são os ómega-6 que apresentam uma percentagem de bioacessibilidade mais elevada, sendo necessário ter em atenção que é um valor muito influenciado pelo valor do ácido linoleico.

Entre o EPA e o DHA, estes apresentam uma percentagem de bioacessibilidade muito semelhante, rondando os 55%

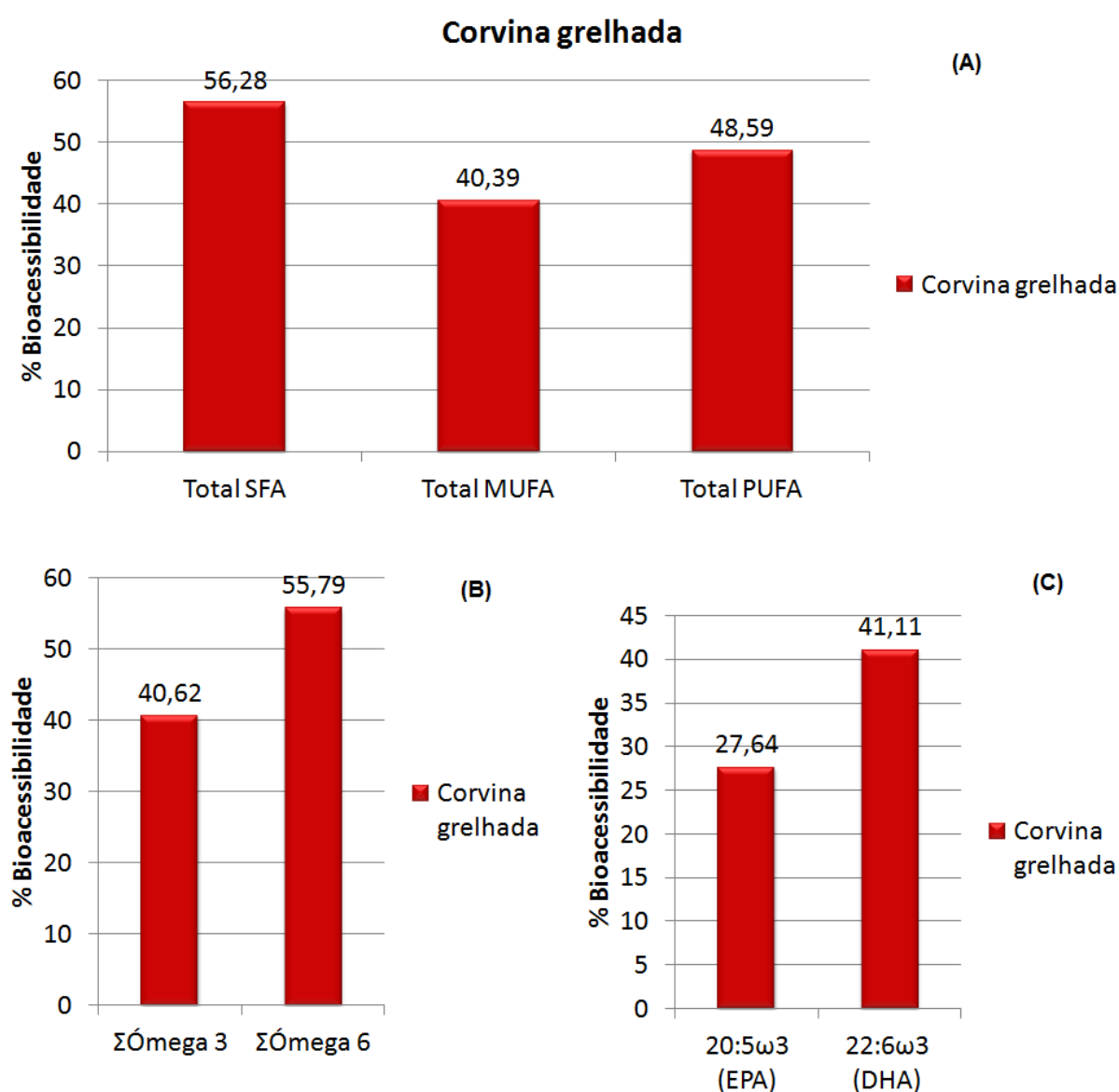


Figura 31: Percentagem de bioacessibilidade dos ácidos gordos na corvina grelhada, de acordo com o grau de saturação (A), configuração ómega-3 e 6 (B) e percentagem de bioacessibilidade do EPA e DHA (C).

Para a corvina grelhada, podemos verificar que se mantém a homogeneidade na bioacessibilidade dos ácidos gordos, apresentando percentagens muito próximas para os SFA, MUFA e PUFA, embora sejam os ácidos gordos saturados os mais bioacessíveis

Além disso, é possível verificar que apesar de na fração inicial a concentração de ómega 3 ser mais elevada que a de ómega 6, são estes últimos que se encontram mais bioacessíveis, tendo uma percentagem de bioacessibilidade de 55,79%.

Relativamente ao EPA e DHA, este último é mais bioacessível, apresentando uma percentagem de 41% em detrimento dos 28% do EPA.

4. Discussão dos Resultados.

Numa fase inicial, avaliando as classes lipídicas dominantes em cada fração das amostras em estudo, verifica-se que, como era esperado, na fração inicial quer da corvina crua quer do Salmão cru é a classe dos Triacilgliceróis a mais expressiva. No entanto, no caso da corvina, esta também apresenta alguns FFA e PL na sua composição inicial, independentemente de estar ou não cozinhada.

Apesar da classe lipídica dominante nesta fração ser a dos TAG, a diferença percentual entre a corvina e o salmão é notória, sendo a do salmão mais elevada, uma vez que se trata de um peixe gordo e, portanto, mais rico em lípidos de reserva (TAG) ao invés de um peixe magro, caso da corvina, que apesar de conter lípidos de reserva contém também, um teor elevado de lípidos estruturais (PL).

Quando o peixe é exposto a tratamentos culinários, mais ou menos agressivos, sofre algumas alterações físicas e químicas, como a perda de água e a concentração dos restantes constituintes, o que se verifica com o aumento das percentagens relativas dos TAG, na fração inicial do salmão grelhado e da corvina grelhada. Nesta última, o aumento é ainda mais considerável, pois como se trata de um peixe magro, contendo um baixo teor lipídico, qualquer alteração se torna mais significativa.

No caso da fração bioacessível, a classe lipídica dominante é a dos FFA, tanto na corvina como no salmão, apresentando ainda percentagens significativas de MAG, DAG e algum CH, o que vai ao encontro do que era esperado, pois segundo García *et al.* (2009) ⁽⁶⁾, o processo digestivo leva à ocorrência da hidrólise dos triacilgliceróis em monoacilgliceróis e em ácidos gordos livres, assim como a hidrólise dos ésteres de colesterol em colesterol e ácidos gordos livres. Também era esperada a hidrólise dos fosfolípidos em lisofosfolípidos, o que se verifica com a redução da classe dos PL, excetuo no salmão cru, onde esta redução

não é tão perceptível, uma vez que a percentagem destes lípidos na composição do salmão é muito reduzida, e na corvina grelhada, dado a exposição a temperaturas elevadas que conduzem à concentração do teor lipídico.

Assim, com base nestes resultados e no cálculo da taxa de hidrólise para as diferentes classes lipídicas, podemos afirmar que o modelo digestivo aplicado é eficiente, havendo a hidrólise completa dos triacilgliceróis, independentemente da espécie ou tratamento culinário, e a formação de ácidos gordos livres, MAG, DAG e algum colesterol. Também ocorre a hidrólise dos fosfolípidos, embora a sua taxa de hidrólise seja menor do que a dos TAG, provavelmente, por se tratar de lípidos estruturais.

Depois de se determinar as classes lipídicas dominantes em cada fração das espécies em estudo e de se averiguar a eficiência do modelo digestivo aplicado, estamos em condições de tentar responder às questões formuladas no início deste estudo.

- 1) Qual a influência do tratamento culinário no perfil lipídico do pescado?
- 2) Qual a bioacessibilidade dos ácidos gordos em cada um dos tratamentos culinários?

Para responder à primeira questão formulada, fez-se uma análise da influência do tratamento culinário na composição química de cada uma das espécies e, à semelhança do que foi verificado noutros estudos, registou-se uma redução no teor de humidade, passando de 59,24 mg/100 g para 50,89 mg/100 g no salmão e de 76,24 mg/100 g para 67,20 mg/100 g na corvina, e a concentração do teor proteico, lipídico e do teor de cinza. No entanto, é de relembrar, que estas alterações dependem, não só do tipo de tratamento culinário, como da espécie de peixe em causa ⁽⁸⁾

Se o tratamento culinário altera a composição química do pescado, altera também, o seu perfil lipídico. Estudos revelam que com o aumento da temperatura há uma concentração do teor de ácidos gordos saturados (SFA), onde o ácido mais dominante é o ácido palmítico, do teor de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), onde o ácido oleico é o mais representativo e verifica-se também, o aumento dos PUFA, com o ácido linoleico a ser dominante ⁽⁸⁾.

No caso do salmão, estas alterações são registadas, havendo um aumento da concentração dos ácidos gordos, onde os MUFA são os ácidos gordos mais representativos do seu perfil lipídico, seguidos dos PUFA e depois pelos SFA, o que está de acordo com a bibliografia consultada.

Em cada um destes grupos existem ácidos gordos que se destacam, tais como o palmítico, o oleico e o ácido linoleico.

Quando comparamos o somatório dos ácidos gordos ômega 3 e ômega 6, os primeiros encontram-se em maior quantidade, contribuindo para isso, o DHA e o EPA. Estes ácidos gordos, aos quais atribuímos grande importância, dado o seu papel na saúde e bem-estar do consumidor, reagem de forma diferente ao tratamento culinário, havendo uma concentração muito mais significativa do DHA do que do EPA., provavelmente porque o DHA é tido como um ácido gordo estrutural, logo, como o salmão é um peixe gordo, tem um teor maior de lípidos de reserva, que são mais facilmente perdidos, conduzindo à concentração dos ácidos gordos estruturais, onde se insere o DHA.

Quanto à corvina, as alterações consistem na concentração de todos os ácidos gordos, sendo que na corvina crua a distribuição dos ácidos gordos é quase por igual, enquanto no tratamento culinário, os mais representativos são os MUFA, logo seguidos dos PUFA e SFA, o que está de acordo com a bibliografia consultada. Dentro desses grupos os ácidos mais expressivos são o ácido palmítico (16:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido linoleico (18:2 ω 6).

Analisando o somatório dos ômega-3 e 6, os primeiros continuam a ser mais representativos, havendo uma grande contribuição do EPA e do DHA. Mas ao contrário do que ocorreu no salmão, o tratamento culinário não levou a uma grande alteração dos valores destes ácidos, o que vem provar a teoria aplicada para o salmão. Como se sabe a corvina é um peixe magro, cujo seu teor de ácidos gordos estruturais é muito superior ao do salmão, e é menos rica em ácidos gordos de reserva. Logo, não existindo muitos ácidos gordos de reserva, que normalmente se localizam numa parte subcutânea do peixe e, portanto, estão mais suscetíveis à ação do calor, não há grandes alterações no teor dos ácidos gordos estruturais.

Assim, para estas duas espécies, a influência do tratamento culinário é exatamente a mesma, a redução do teor de humidade e a concentração dos teores de cinza, de proteína e de lípidos, sendo a única diferença, o valor mais elevado dos lípidos no salmão do que na corvina, lembrando que esta é mais rica em ácidos gordos estruturais e o salmão, mais rico em ácidos gordos de reserva.

Para tentar responder à segunda questão foram comparados os valores absolutos das amostras iniciais com os valores das amostras bioacessíveis, em cru e no grelhado, calculando por fim, a taxa de bioacessibilidade que nos dá a percentagem dos ácidos gordos presentes na fração inicial que é, efetivamente absorvida pelo organismo humano.

No entanto, nesta fase do estudo não foram encontrados resultados de outros trabalhos ou investigações sobre este tema que nos pudessem servir de referência, uma vez que é um estudo, ainda muito experimental e complexo, na área dos lípidos.

Começando pelo salmão cru, podemos verificar que as quantidades de ácidos gordos presentes no bioacessível são sempre inferiores às quantidades iniciais, o que seria de esperar, visto que segundo Karin *et al.* (2003)⁽³⁰⁾, a bioacessibilidade é a quantidade de um determinado composto, que é libertada da matriz do alimento, logo não poderá ser superior à quantidade existente no alimento inicial, e que fica disponível para absorção pelo organismo.

Tal como na amostra inicial, também no bioacessível, os ácidos gordos dominantes são os MUFA, seguindo-se os PUFA e os SFA, sendo os ácidos palmítico, oleico e linoleico, aqueles que mais se evidenciam nesta fração. Contudo, a maior percentagem de bioacessibilidade é atribuída aos ácidos gordos polinsaturados, sendo que dentro destes, o DHA é o ácido gordo mais bioacessível, com 92,30% de bioacessibilidade, o que é uma ótima informação para o consumidor.

Relativamente aos ácidos gordos ómega 3 e 6, estes têm percentagens de bioacessibilidade muito semelhantes, não havendo grande distinção entre eles.

No salmão grelhado, os valores de ácidos gordos são mais elevados, mas as relações mantêm-se, continuando a ser os MUFA, os ácidos gordos mais representativos no bioacessível, mas são os PUFA os ácidos gordos com maior percentagem de bioacessibilidade, 60,72 %.

Neste caso, o DHA, apesar de ainda ser bastante bioacessível, a sua percentagem de bioacessibilidade é mais reduzida (60,22%) que no salmão cru, possivelmente, devido a algumas perdas durante o tratamento culinário. No entanto, tanto o DHA como o EPA continuam a contribuir para que o somatório dos ómega 3 seja superior ao somatório dos ómega 6.

Relativamente à corvina crua, são notórios os valores mais reduzidos de ácidos gordos e a sua distribuição quase homogênea entre SFA, MUFA e PUFA, que se mantém também, na fração bioacessível, apesar dos PUFA estarem em maior quantidade, sendo também eles os ácidos gordos com maior percentagem de bioacessibilidade (94,13%), seguidos dos SFA e dos MUFA.

No entanto, neste caso temos três ácidos gordos, o ácido esteárico (18:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido linoleico (18:2ω6), com percentagens de bioacessibilidade superiores a 100%, o que nos indica que houve formação de gordura. Mas como foi referido anteriormente, sabemos que a solução de enzimas que estamos a adicionar no nosso ensaio de bioacessibilidade incrementa gordura nas amostras, tendo o seu perfil lipídico revelado exatamente estes três ácidos gordos como os mais dominantes, o que pode estar

a influenciar estes valores, apesar de ter sido feito o ajuste à gordura da amostra. Isto faz-nos supor, que o teor de gordura da solução de enzimas pode variar de acordo com a alíquota retirada, o que faz sentido, pois a bÍlis tem um contributo significativo para o teor lipídico e é um composto de difícil dissolução e homogeneização, podendo estar em maior quantidade em certas alíquotas, o que pode ter acontecido com a corvina crua, levando a que o ajuste que foi feito à gordura da amostra não tenha sido suficiente.

Já na corvina grelhada, isso não se verifica, apesar de se manter a distribuição homogénea dos ácidos gordos pelos SFA; MUFA e PUFA, quer na fração inicial como na fração bioacessível. No entanto, os ácidos gordos com maior percentagem de bioacessibilidade são os ácidos gordos saturados, com 56,28%, contra os 48,59% dos PUFA e os 40,3% dos MUFA. O que nos indica, que o fato de um peixe ser magro, não nos garante que seja mais saudável.

Assim, podemos verificar que apesar do salmão ser considerado um peixe gordo, rico em ácidos gordos de reserva, o organismo humano absorve mais os ácidos gordos polinsaturados, associados aos lípidos estruturais, uma vez que os lípidos de reserva são os mais afetados pelo tratamento culinário.

Contrariamente, a corvina é um peixe magro, com menor teor de ácidos gordos de reserva e rica em ácidos gordos estruturais, mas os ácidos gordos com maior percentagem de bioacessibilidade são os ácidos gordos saturados.

5. Conclusão.

Nos últimos tempos, o consumidor comum tem vindo a preocupar-se, cada vez mais, com a sua saúde, bem-estar e, conseqüentemente, com a sua alimentação. Assim, dada esta tendência, o consumo de produtos da pesca tem aumentado, dado o conhecimento da composição química e nutricional destes alimentos.

No entanto, o fato de um determinado alimento ter certa composição química e nutricional, não nos garante que o organismo humano absorva todos esses compostos, exatamente como eles são apresentados inicialmente.

Como, atualmente, a importância dada ao peixe advém da sua composição lipídica, este estudo centrou-se, essencialmente, na influência dos tratamentos culinários e na bioacessibilidade deste composto maioritário.

Assim, ao analisar a influência de um tratamento culinário, grelhar, na composição lipídica do salmão e da corvina, concluiu-se que as elevadas temperaturas promovem a perda de humidade do alimento e, por consequência, a concentração dos seus outros constituintes, entre os quais, os lípidos.

Mas daqui, podemos também concluir, que é importante saber em que classe lipídica se encontram os ácidos gordos estudados, pois caso se trate de um peixe gordo, estes estarão, maioritariamente, na classe dos triacilglicerois, considerados lípidos de reserva, que se situam numa região subcutânea do peixe e que são mais facilmente “atacados” pelas elevadas temperaturas, ao invés, dos ácidos gordos que se encontram na classe dos PL, que são essencialmente lípidos de estrutura, localizados mais internamente no músculo do peixe, logo menos acessíveis.

Relativamente à bioacessibilidade, concluímos que no caso do salmão, os ácidos gordos polinsaturados, são os mais bioacessíveis, enquanto na corvina, são os ácidos gordos saturados. Concluímos também, que as percentagens de bioacessibilidade rondam valores entre os 40 e o 60%, embora nalguns casos, a quantidade de ácidos gordos que fica disponível para ser absorvida é quase a totalidade da existente na amostra inicial.

Com este estudo, concluímos que a indicação da composição química e nutricional do pescado não é suficiente para informar e ajudar o consumidor. Além da composição química é necessário detalhar essa informação, que no caso dos lípidos passa por referenciar as quantidades e a predominância de determinados ácidos gordos, assim como as classes lipídicas onde estes se encontram.

Relativamente às espécies em estudo, conclui-se que há maiores benefícios no consumo do salmão, que fornece e disponibiliza ao organismo, maiores quantidade de DHA e de ácidos gordos polinsaturados, do que no consumo da corvina, que apesar do seu menor teor lipídico, disponibiliza mais ácidos gordos saturados.

6. Perspetivas Futuras.

O estudo da bioacessibilidade, principalmente no que se refere aos lípidos no pescado, é ainda muito recente, faltando ainda muito trabalho para concluir este assunto. No entanto no decorrer desta dissertação, levantaram-se algumas questões que seriam importantes de esclarecer para se poder fazer um estudo mais pormenorizado do perfil lipídico das diferentes espécies e da bioacessibilidade dos ácidos gordos ómega 3 e ómega 6.

Como foi dito logo no início desta dissertação, este estudo está ainda numa fase muito experimental, onde ainda se tenta adaptar e otimizar os modelos utilizados para a matriz alimentar em questão. No entanto, com o avanço de mais uma etapa, vamos descobrindo os pontos onde devemos melhorar, ou simplesmente, onde devemos fazer de forma diferente. Ao realizar este estudo foi perceptível que as quantidades de amostra utilizadas são demasiado reduzidas, levando-nos a trabalhar em gamas de valores muito baixos, onde um pequeno erro, toma proporções significativas. Assim, futuramente este tipo de estudos deverá ser feito com massas de amostra maiores, principalmente no caso de peixes mais magros.

Seria relevante fazer, também, o estudo do perfil lípico de várias amostras da solução de enzimas adicionada a quando da simulação da digestão e absorção dos lípidos, pois dada a limitação de tempo para este trabalho, apenas foi feita uma análise. Contudo, devido à dificuldade em homogeneizar a bÍlis, juntamente com todas as outras enzimas, desconfia-se que as amostras variem entre si, sendo importante encontrar um valor médio de teor lipídico para assim se ajustar, mais corretamente, o teor lipídico das amostras em estudo.

Depois de esclarecida esta questão, seria necessário dar continuidade a este estudo, avaliando ao pormenor cada classe lipídica de cada uma das frações e averiguar qual o perfil lipídico de cada uma e qual a sua contribuição para o perfil da amostra inicial e bioacessível, uma vez que as amostras já estão preparadas e prontas a analisar.

Assim, depois de aprofundar este estudo, a perspetiva seria alargar o leque de espécies estudadas e avançar para um estudo de pescado em conserva, como o atum, avaliando a bioacessibilidade, não só lipídica, mas de todos os outros constituintes, incluindo os compostos tóxicos e averiguar quais os prós e os contras do consumo destes produtos.

Bibliografia

1. BANDARRA, N. M.; CALHAU, M. A.; OLIVEIRA, L. RAMOS, M.; DIAS, M.; BARTOLO, H.; FARIA, M. R.; FONSECA, M. C.; GONÇALVES, J.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.- **Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal.** *Publicações avulsas do IPIMAR.* Lisboa. ISSN.0872 – 914X, nº 11, (2004), pp.11,12,13,60,61,92,93.
2. NUNES, M. L.; BATISTA, I.; BANDARRA, N. M.; MORAIS, M. G.; RODRIGUES, P. O.- **Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores.** *Publicações avulsas do IPIMAR.* Lisboa. ISSN.0872 – 914X, nº 18, (2008), pp. 16,19,23,30,31,38,40.
3. FAO, Fishery and Aquaculture.- **FAO yearbook - Fishery and Aquaculture Statistics.** Roma: FAO, 2010. ISBN: 978-92-5-007253-1.
4. MONFORT, M. C. – Present Market Situation and Prospects of Meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. **FAO: Chemical fisheries commission for the Mediterranean.** ISSN: 1020-9549. nº. 89 (2010), p. 1-28.
5. KOLAKOWSKA, A.; OLLEY, J.; DUNSTAN, G. A. - Fish lipids. In: SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A. - **Chemical and Functional properties of Food Lipids.** 1ª ed. : CRC Press LLC, 2003. ISBN: . Cap.12, p. 221-264.
6. FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.- In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research.** ISSN: 0271-5317. nº. 29 (2009), p. 751-760.
7. WEBER, J.; BOCHI, V. C.; RIBEIRO, C. P.; VICTÓRIO, A. M.; EMANUELLI, T. - Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia queten*) fillets. **Food Chemistry.** ISSN: . nº. 106 (2008), p. 140-146.
8. MAULVAULT, Ana Luísa Marques Paixão de Carvalho. - *Valor nutricional de algumas espécies consumidas em Portugal.* Faro: Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve, 2009. Dissertação de Mestrado.
9. DGRM. *Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos .- Aquicultura – Introdução.* [Em linha]. Lisboa: DGRM. [consult. 27 de Nov. 2012.] Disponível em [www:<URL: http://www.dgrm.min-agricultura.pt>.](http://www.dgrm.min-agricultura.pt)
10. FAO, Fishery and Aquaculture. – **The state of world fisheries and aquaculture.** Roma: FAO, 2012. ISBN:
11. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. - **Cultured Aquatic Species Information Programme.** [Em linha]. Food and Agriculture Organization of the United

Nations. [consult. 20 Maio 2012] Disponível em WWW:<URL:http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en.>.

12. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. - **Cultured Aquatic Species Information Programme**. [Em linha]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Consult. 20 Maio 2012]. Disponível em WWW:<URL: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en.>.
13. DUARTE, D. R. S. - *Alimentos funcionais com microalgas : Nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3*. Lisboa: Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2010. Dissertação de Mestrado.
14. CAMPOS, Luís S. - **Entender a Bioquímica**. 4ª ed. Lisboa: Escolar Editora, 2002. ISBN: p. 351-422.
15. MORADI, Y.; BAKAR, A.; MOTALEBI, A.; SEYD MUHAMAD, S. H.; CHE MAN, Y. - A Review on fish lipid: Composition and changes during cooking methods. **Journal of aquatic food product technology**. ISSN: . Vol. 20, nº. (2011), p. 379-390.
16. CHRISTIE, W. W. - **Gas chromatography and lipids - A practical guide**. 1ª ed. Scotland: The press oil, 1989. ISBN:
17. KING, Michael W. – **Lipoproteínas**. [Em linha]. The Medical Biochemistry Page [Consult. 1 Nov. 2012]. Disponível em WWW: <URL: http://themedicalbiochemistrypage.org/lipoproteins.php.>.
18. VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; VAN DE KAMP, E.; ROMPELBERG, C. J. M; SIPS, A. J. A. M. - Applicability of an in vitro digestion model in assessing in bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN:0278-6915. nº. 43 (2005), p. 31-40.
19. MARTIN, D.; NIETO-FUENTES, J. A.; SEÑRÁNS, F. J.; REGLERO, G.; SOLER-RIVAS, C. - Intestinal digestion of fish oils and n-3- concentrates underin vitro conditions. **European Journal of lipid science and technology**. ISSN: . nº. 112 (2010), p. 1315-1322.
20. PÉREZ, M. J.; RODRIGUEZ, C.; CEJAS, J. R.; MARTIN, M. V.; JEREZ, L.; LORENZO, A. - Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at defferent stages of reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Phisiology**. ISSN: . Vol. 146, nº. (2006), p. 187-196.
21. AL-KHALIFA, A. S. - Effects of cooking by different methods on the polyunsaturated fatty acids in six fish species. **Agriculture Science**. ISSN: . Vol. 10, nº. (1998), p. 133-144.
22. JUÁREZ, M. D.; ALFARO, M. E.; SAMMÁN, N. - Nutrient retention factors of deep-fried milanesas. **Journal of Food Composition and Analysis**. ISSN: . Vol. 17, nº. (2003), p. 119-124.

23. GLADYSHEV, M. I.; SUSHCHIK, N. N.; GUBANENKO, G. A.; DEMIRCHIEVA, S. M.; KALACHOVA, G. S. - Effect of boiling and frying on the content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of four fish species. **Food Chemistry**. ISSN: . Vol. 101, nº. (2006), p. 1694-1700.
24. BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L. - Chemical composition and nutritional value of raw and cooked black scabbardfish (*Aphanopus carbo*). **Scientia Marina**. ISSN: . Vol. 73s2, nº. (2009), p. 105-113.
25. NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. - Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. ISSN: . Vol. 96, nº. (2001), p. 53-59.
26. MUSAIGER, A.; D'SOUZA, R. - The effect of different cooking methods on proximate mineral and heavy metal composition of fish and shrimps consumed in the Arabian Gulf. **Archives Latino-americanos de Nutrición**. ISSN: . Vol. 58, nº. (2008), p. 103-109.
27. SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N. - Effects of grilling on cholesterol oxide formation and fatty acids alterations in fish. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. ISSN: . Vol. 30(2), nº. (2010), p. 385-390.
28. ARKBAGE, K.; VERWEI, M.; HAVENAAR, R.; WITTHOFT, C. – Bioaccessibility of folic acid an (6S)-5-Methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. **The journal of nutrition**. ISSN:0022-3166 . Vol. Nutritional Methodology, nº.133 (2003), p. 3678-3683.
29. HORNERO-MÉNDEZ, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. - Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative food science and emerging technologies**. ISSN: 1466-8564. nº. 8 (2007), p. 407-412.
30. VASSILOPOULOU, E.; RIGBY, N.; MORENO, F. J.; ZUIDMEER, L.; AKKERDAAS, J.; TASSIOS, I.; PAPADOPOULOS, N. G.; SAXONIPAPAGEORGIOU, P.; REE, R.; MILLS, C. - Effects of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. **Food Allergy, anaphylaxis, dermatology and drug allergy**. ISSN: 0091-6749. nº. Agosto (2006), p. 473-480.
31. CABAÑERO, A. I.; MADRID, Y.; CÁMARA, C. - Selenium and Mercury Bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. **Analytica Chimica Acta**. ISSN: 0003- 2670. nº. 526 (2004), p. 51-61.
32. BLIGH, E.; DYER, W. - A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**. ISSN: . Vol. 37 (1959), p. 911-917.
33. BANDARRA, N. M.; BATISTA, I.; NUNES, M. L.; EMPÍIS, J. M. - Seasonal variation in the chemical composition of the horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). **Eur. Food Res. Technol**. ISSN: . Vol. 212, nº. (2001), p. 535-539.

34. LEPAGE, G.; ROY, C. C. - Direct transesterification of all classes of lipids in a one step reaction. **Journal of lipid Research**. ISSN: . Vol. 27 (1986), p. 114-120.
35. WEIHRAUCH, J. L.; POSATI, L. P.; ANDERSON, B. A.; EXLER, J. - Lipid conversion Factors for calculating fatty acid contents of food. **Journal of the American oil chemists society**. ISSN: . nº. 54 (1977), p. 36-40.
36. OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C.J. M.; BRUIL, M. A.; DOBBE, C.J. G.; PEREBOOM, D.P. K.H.; SIPS, A.J. A.M. - Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**. ISSN: . Vol. 44, nº. (2003), p. 281-287.

Cibergrafia.

- a) http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/2-science_update_1284046.pdf
- b) <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1394/916>
- c) <http://www.foodscience-avenue.com/2008/07/nutritional-value-of-fats-and-fats.html>
- d) <http://biointerativafisio.blogspot.pt/2010/12/metabolismo-de-lipideos-oii-gente-neste.html>
- e) http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/2-science_update_1284046.pdf
- f) <http://www.insa.pt>
- g) <http://pt.wikipedia.org/wiki/Colesterol>

Anexos

Anexo I: Modelo de digestão *In vitro*.

Os modelos de digestão *in vitro* surgem como uma alternativa apelativa aos modelos *in vivo*, que são muito complexos, caros e morosos. Em contraste, os modelos *in vitro* são bastante mais simples, rápidos e com menos custos⁽³¹⁾, simulando de forma simplificada, os processos envolvidos na digestão na boca, estômago e no intestino delgado, permitindo assim, investigar o que acontece a determinados compostos durante o seu percurso gastrointestinal. Para que os resultados sejam à semelhança dos obtidos na digestão *in vivo* têm que se aplicar condições fisiológicas básicas, como a composição química dos fluídos digestivos, o pH e tempo de residência típico de cada compartimento, iguais ou semelhantes às do sistema digestivo⁽¹⁸⁾.

O primeiro modelo de digestão *in vitro* foi introduzido por Oomen et al. (2003)⁽³²⁾ e consistia na simulação do processo digestivo em três passos, na boca, estômago e intestino delgado, tendo-se excluído o trato no intestino grosso por não estar envolvido na absorção de componentes. No entanto, este modelo simulava os processos digestivos em condições de jejum, o que não era indicador da absorção de nutrientes no decorrer da alimentação, tendo sido necessário fazer algumas alterações⁽¹⁸⁾.

Desde então, Versantvoort *et al.*, 2004⁽¹⁸⁾ tem vindo a descrever o desenvolvimento deste novo modelo de digestão *in vitro*. Segundo referências bibliográficas, foi desenvolvida uma refeição padrão, enriquecida com óleo de girassol, a qual era adicionada ao produto que se pretendia testar, criando assim, uma condição padrão de alimentação⁽¹⁸⁾. Depois, os sucos digestivos, preparados artificialmente, foram alterados e adaptados de acordo com a descrição apresentada na **tabela apresentada a seguir**.

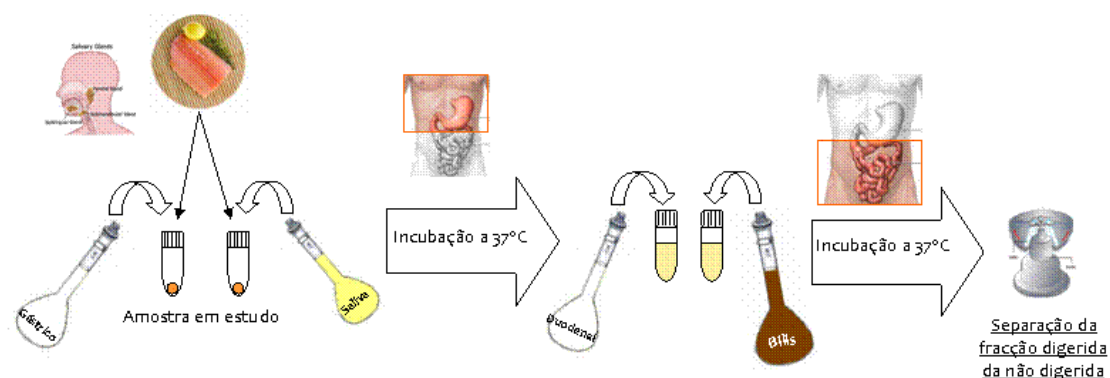
Fluídos digestivos				
Compostos	Saliva (50 mL)	Suco Gástrico (100 mL)	Suco Duodenal (100 mL)	Suco Biliar (50 mL)
Solução inorgânica				
KCl (89,6 g/L)	10 mL	9,2 mL	6,3 mL	4,2 mL
KSCN (20g/L)	10 mL	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ (88,8 g/L)	10 mL	3,0 mL	-	-
NaSO ₄ (57 g/L)	10 mL	-	-	-
NaCl (175,3 g/L)	1,7 mL	15,7 mL	40 mL	30 mL
NaHCO ₃ (84,7 g/L)	20 mL	-	40 mL	68,3 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (22,2 g/L)	-	18 mL	-	-
NH ₄ Cl (30,6 g/L)	-	10 mL	-	-
KH ₂ PO ₄ (8 g/L)	-	-	10 mL	-
MgCl ₂ (5 g/L)	-	-	10 mL	-
HCl 37% g/g	-	6,5 mL	180 µL	150 µL
Solução orgânica				
Urea (25 g/L)	8 mL	3,4 mL	4 mL	10 mL
Ácido Glucorônico (2 g/L)	-	10 mL	-	-
Glucose (65 g/L)	-	10 mL	-	-
Hidrocloreto de glucosamina (33 g/L)	-	10 mL	-	-
Enzimas				
α- Amilase	290 mg	-	-	-
Ácido úrico	15 mg	-	-	-
Mucina	25 mg	3 g	-	-
BSA	-	1 g	1 g	1,8 g
Pepsina	-	2,5 g	-	-
Pancreatina	-	-	9 g	-
Lípase	-	-	1,5	-
CaCl ₂ .2H ₂ O (22,2 g/L)	-	-	9 mL	10 mL
Bílis	-	-	-	30 g
pH	6,8 ± 0,2	1,30 ± 0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

Adaptado de VERSANTVOORT et al, 2005 (18).

Todos os fluidos digestivos que são adicionados são aquecidos a 37°C, simulando a temperatura média corporal ⁽¹⁸⁾.

Assim, a digestão inicia-se pela adição de 6 mL de saliva a 4,5 g do alimento ou da refeição padrão, sendo incubado por 5 minutos. Depois, adicionam-se 12 mL de suco gástrico e a mistura é agitada com rotação centrífuga de 55 rpm a 37 °C, durante 2 horas. Por fim, adicionam-se, simultaneamente, 12 mL de suco duodenal, 6 mL de bílis e 2 mL de solução de bicarbonato (1 M) e a mistura é novamente colocada em rotação por mais 2 horas a 37 °C, obtendo-se assim, uma mistura suave mas completa da matriz com os sucos digestivos ⁽¹⁸⁾.

No final do processo, os tubos de digestão são centrifugados por 5 minutos a 2750 g's, separando o sobrenadante, fase aquosa que é absorvida pelo intestino delgado, do *pellet*, fração sólida que não é absorvida pelas paredes do epitélio intestinal, uma vez que se assume que todas as moléculas mobilizadas a partir da sua matriz ficam, em princípio, disponíveis para transporte através do epitélio intestinal ⁽¹⁸⁾.



Anexo II – Metodologias para determinação da composição química.

A. Humidade e cinza.

A humidade é determinada de acordo com a Norma Portuguesa NP 2282.

As caixas de *petri*, previamente identificadas, são colocadas numa estufa a 105 °C durante cerca de 30 min. Ao fim deste tempo, as caixas são transferidas para um exsicador, onde arrefeceram até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, pesaram-se as caixas de *petri*, registando a sua massa.

Posteriormente, pesou-se 10 g de amostra húmida numa balança de precisão 0,001 g, registando-se o valor e colocando-se as caixas de *petri* com as amostras húmidas numa estufa a 105±2 °C, durante uma noite. Por fim, retiraram-se as caixas da estufa, deixando arrefecer em exsicador até atingirem a temperatura ambiente, e pesou-se a caixa com a amostra seca. Registou-se o valor e calculou-se o teor em humidade utilizando a fórmula:

Teor de humidade (%)

$$= 100 - \left[\frac{m(\text{caixa de petri} + \text{amostra seca})(g) - m(\text{caixa de petri})(g)}{m(\text{amostra})(g)} \times 100 \right]$$

Para a determinação da cinza, utilizou-se a metodologia da NP 2032 de 1988, um método simples, que consiste na queima da amostra em mufla, utilizando temperaturas de 550 a 570 °C.

Colocar os cadinhos na estufa a 105 °C, durante aproximadamente 30 minutos e deixar arrefecer em exsicador, pesando-os no final.

Depois, pesar 5 g de amostra, numa balança de precisão 0,001 g, e colocar os cadinhos na estufa a 100 °C durante uma noite para, posteriormente, os transferir para uma mufla a 200 °C. A temperatura da mufla foi depois aumentada gradualmente, até se atingir 500 °C (aumentou-se 50 °C de 30 em 30 minutos, exceto nos períodos correspondentes à passagem de 300 a 350 °C e de 350 – 400 °C nos quais se aumentou a temperatura de 1 em 1 hora). Uma vez atingidos os 500 °C, deixaram-se as amostras na mufla durante uma noite. Findo este período, transferiram-se os cadinhos para um exsicador, onde arrefeceram até à temperatura ambiente e pesou-se o conjunto cadinho+cinza. Este último passo foi repetido 3 a 4 vezes até o peso começar a subir. Para o cálculo do teor em cinza escolheu-se o valor mais baixo e recorreu-se à fórmula:

Teor de cinza (%)

$$= \frac{\text{massa}(\text{cadinho} + \text{amostra incinerada})(g) - \text{massa}(\text{cadinho})(g)}{\text{massa}(\text{amostra})(g)} \times 100$$

B. Proteína (FP-528 DSP).

O FP-528DSP é um determinador de proteínas/Azoto.

1. A amostra é pesada e envolta em papel de estanho (Tin Foil) e colocada na cabeça de carga e purga de qualquer gás que surja do seu processo de preparação. Paralelamente o sistema que recolhe dos gases de combustão Ballast® (sistema patenteado por LECO®), também é purgado.

2. **Combustão:** A amostra entra no forno aquecido a 1000 °C e é introduzido oxigénio puro para acelerar o processo de combustão. Os produtos resultantes da combustão (CO₂, H₂O, NO_x, N₂) são passados por um filtro no forno e por um refrigerador termo-eléctrico para tirar a humidade, sendo recolhidos no Ballast®.

3. **Análise:** Os gases obtidos na combustão são homogeneizados no Ballast® através de uma mistura passiva. Uma alíquota de 3 cc é capturada pelo Ballast® e forçada a evacuar. A amostra gasosa de 3 cc passa através de uma coluna de cobre para remover o oxigénio e reduzir o NO_x a N₂. A amostra continua o seu percurso dentro do equipamento passando agora por Lecosorb® para remover o CO₂ e por Anhidrone para reter a H₂O. Finalmente o N₂ é arrastado por uma corrente de gás hélio até uma célula de condutividade térmica (TC) onde se mede a concentração de N₂ presente na amostra.

4. **Resultado:** Os resultados finais são expressos em N₂ ou N₂/Proteína e registado no programa do equipamento.

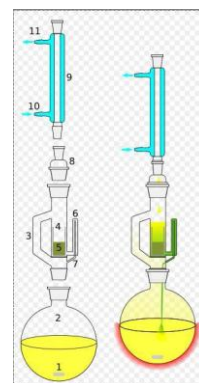
C. Lípidos totais.

O teor de gordura livre total foi determinado de acordo com a norma NP 1972 (2009).

Soxhlet é um método de extração a quente que trabalha com um refluxo descontínuo e intermitente de solvente com a vantagem de evitar a temperatura alta de ebulição do solvente, pois a amostra não fica em contato direto com o solvente quente, evitando assim a decomposição da gordura na amostra. Os dois solventes mais utilizados são o éter de petróleo e o éter etílico.

Este método é bastante eficiente para amostras secas, onde é possível determinar ácidos gordos e fosfolípidos, porém, gasta-se um grande volume de solvente que pode acarretar na saturação do solvente que fica em contato com a amostra antes de ser sifonado. O solvente utilizado é de baixa polaridade, extraíndo com maior eficiência os lípidos apolares e, eventualmente, pode não extrair a totalidade dos lípidos com polaridades elevadas, dando origem a um resultado falso por defeito. Também a existência de água na amostra impede a penetração do solvente (Éter é higroscópico).

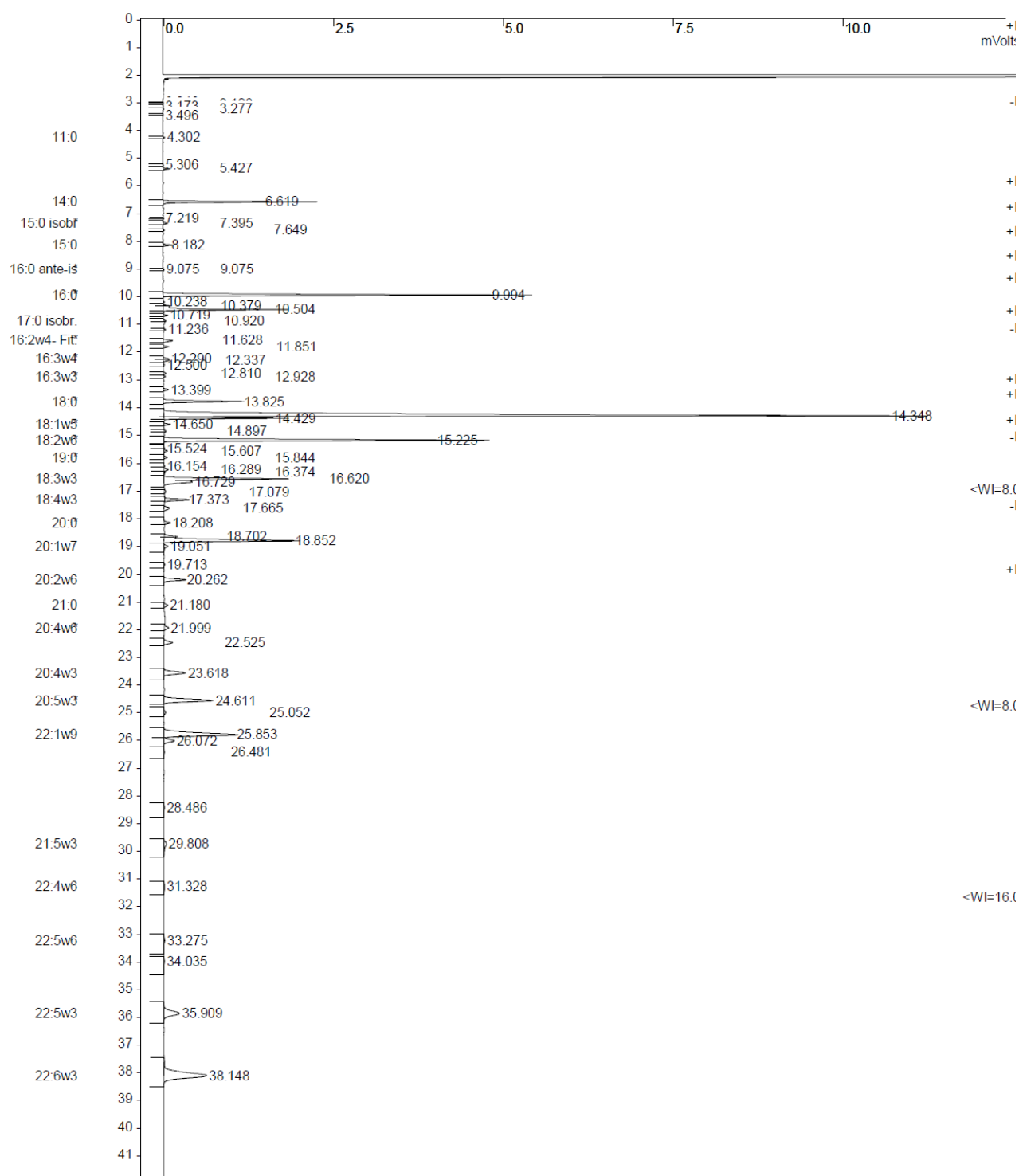
Para determinar o teor em gordura, pesaram-se 10 g de cada amostra húmida para um almofariz, previamente identificado e tarado, e adicionou-se uma colher de sulfato de sódio anidro, triturando e homogeneizando com o auxílio de um pilão. Depois, transferiu-se cada amostra para dois papéis de filtro e fez-se um cartuxo bem apertado de forma a envolver todo o material biológico, colocando-se em seguida dentro de tubos extratores. Simultaneamente, colocou-se alguns balões volumétricos de fundo raso numa estufa a 105 °C durante 1 hora para eliminar alguma humidade existente. Após o arrefecimento em exsicador, pesagem e identificação dos balões, adicionou-se 80 mL de éter etílico e montaram-se os tubos que continham os cartuxos juntamente com os balões. Perfez-se o volume com éter etílico até o cartuxo estar completamente submerso neste solvente.



Cada conjunto extrator com cartuxo+balão foi colocado num aparelho de *Soxhlet* (bateria de placas *P Selecta*), no qual permaneceu em placa de aquecimento durante um período de 7 horas. No final deste tempo, extraiu-se o éter por evaporação em placa quente e secaram-se os balões numa estufa a 105 °C durante 30 minutos. Transferiram-se os balões com gordura para um exsicador onde se deixou arrefecer até à temperatura ambiente e pesou-se, registando o valor. Repetiu-se este passo até se atingir peso constante e calculou-se o teor de gordura com base na fórmula:

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{\text{massa}(\text{balão} + \text{gordura})(g) - \text{massa}(\text{balão})(g)}{\text{massa}(\text{amostra})(g)} \times 100$$

Anexo III: Cromatograma dos TAG do Salmão Cru inicial e respetivo relatório.



[illegible]

Downloaded from <http://www.jstor.org/stable/2346129> by University of California, San Diego on Tue, 20 Jun 2017 12:02:00 UTC
All use subject to <http://about.jstor.org/terms>

```

Name      : julia
Language   : Julia
Source Code : https://github.com/JuliaLang/julia
License    : MIT
Platform   : Linux
OS         : Linux
CPU        : x86_64
GPU        : NVIDIA GeForce GTX 1080

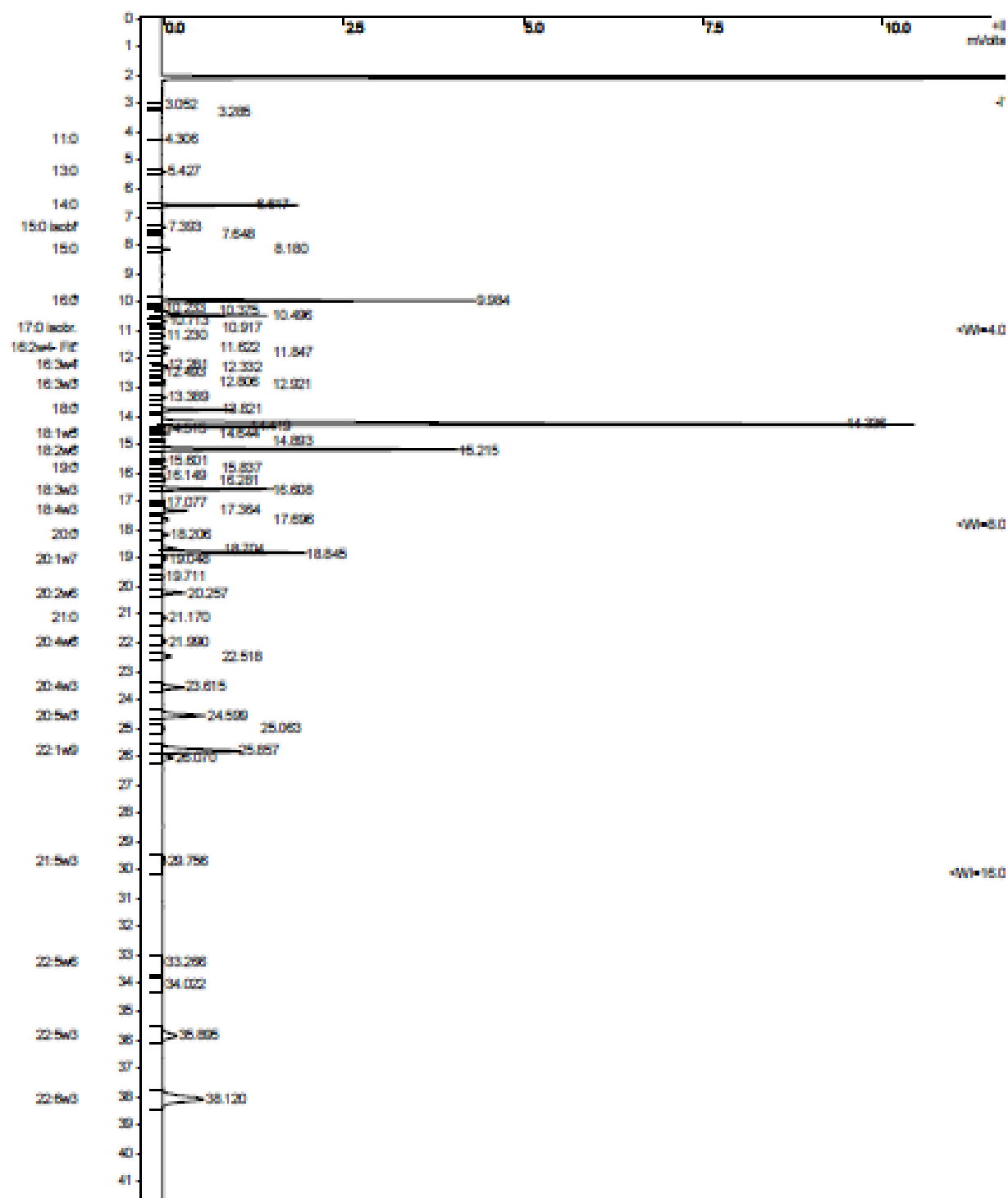
```

DOI: 10.1002/for

Species: <i>Microtus</i>	Sex: Male	Age: 1 year	Weight: 100g
Species: <i>Microtus</i>	Sex: Female	Age: 1 year	Weight: 100g
Species: <i>Microtus</i>	Sex: Male	Age: 1 year	Weight: 100g
Species: <i>Microtus</i>	Sex: Female	Age: 1 year	Weight: 100g

Index	Peak Name	Baseline (1)	Peak-Offset (mm/s)	Peak-Width (mm/s)	Area (mm/s*au)	Height (Counts)	Width (mm/s)	Structure Constant
1		0.00	3.040	0.000	1.0	PPV	1.0	
2		0.00	3.100	0.000	0	PPV	1.0	
3		0.00	3.170	0.000	1.0	PPV	1.0	
4		0.00	3.277	0.000	0.0	PPV	1.0	
5		0.00	3.400	0.000	0	PPV	1.0	
6	13x2	0.04	3.350	+0.001	0.1	PPV	1.0	
7	13x2		3.750					int
8		0.00	3.300					
9		0.14	3.407	0.000	0.0	PPV	1.1	
10	14x2 tandem		3.400					int
11	14x2	0.00	3.400	0.000	0.000	PPV	1.0	
12		0.00	7.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
13	15x2 tandem	0.11	7.000	0.010	1.00	PPV	1.0	
14	15x2 asymmetric	0.04	7.040	0.010	0.7	PPV	1.0	
15	15x2	0.00	8.000	0.010	0.00	PPV	1.0	
16	15x2 asymmetric	0.00	8.070	0.017	0.4	PPV	1.0	
17	16x2	0.00	9.000	0.000	171.0	PPV	1.0	
18	16x2	0.04	10.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
19		0.00	10.070	0.000	0.0	PPV	1.1	
20	16x2x2	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.7	
21		0.10	10.100	0.000	1.00	PPV	1.0	
22	17x2 tandem	0.00	10.000	0.001	0.0	PPV	1.0	
23		0.00	10.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
24	16x2x2 Pile	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.0	
25	17x2	0.10	10.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
26	16x2	0.17	10.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
27		0.00	10.000	0.000	0.00	PPV	1.1	
28		0.00	10.000	0.000	0.0	PPV	1.1	
29	17x1	0.00	10.000	+0.001	0.0	PPV	1.0	
30	16x2	0.14	10.000	0.000	0.07	PPV	1.0	
31	16x2	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.0	
32	16x2	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.0	int
33	16x2	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.0	
34	16x2x2	0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.7	
35		0.00	10.000	0.000	0.000	PPV	1.0	
36	16x2	0.17	10.000	0.000	0.07	PPV	1.7	
37	16x2 tandem	0.00	10.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
38	16x2x2	0.00	10.000	0.070	0.000	PPV	1.0	
39	16x2	0.00	10.000	+0.000	0.0	PPV	1.0	
40		0.10	10.000	0.000	0.1	PPV	1.1	
41	16x2	0.10	10.000	0.001	0.00	PPV	1.7	
42		0.04	10.100	0.000	0.0	PPV	1.0	
43	16x2x2	0.00	10.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
44		0.07	10.070	0.000	1.10	PPV	1.0	
45	16x2	0.00	10.000	0.000	0.00	PPV	1.7	
46		0.07	10.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
47		0.00	17.070	0.000	1.00	PPV	1.0	
48	16x2x2	0.00	17.070	0.000	0.00	PPV	1.7	
49		0.00	17.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
50	20x2	0.00	18.000	0.000	0.00	PPV	1.1	
51	20x2x1		18.000					int
52	20x2x1		18.000					
53		0.00	18.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
54	20x2x2	0.00	18.000	0.070	0.00	PPV	1.0	
55		0.00	18.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
56	20x2x2	0.00	20.000	0.070	1.00	PPV	1.0	
57	20x2	0.17	20.000	0.070	0.00	PPV	1.0	
58	20x2x2	0.01	20.000	0.000	0.01	PPV	1.0	
59	20x2x2	0.00	20.000	0.000	0.00	PPV	1.7	
60	20x2x2	0.04	20.000	0.000	0.00	PPV	1.1	
61	20x2x2	0.04	20.000	0.000	0.00	PPV	1.1	
62	20x2x2	0.10	20.000	0.000	0.00	PPV	1.7	
63	20x2x1	0.10	20.000	0.000	0.00	PPV	1.7	
64	20x2x1		20.000					int
65	20x2x2	0.00	20.000	+0.000	0.00	PPV	1.0	
66		0.04	20.070	0.000	1.00	PPV	1.0	
67		0.00	20.000	0.000	0.0	PPV	1.0	
68	21x2x2	0.00	20.000	0.171	0.00	PPV	1.0	
69	20x2		20.000					int
70	20x2x2	0.11	20.000	0.147	1.00	PPV	1.0	
71	20x2x2	0.04	20.070	0.140	1.01	PPV	1.0	
72		0.07	20.000	0.000	1.11	PPV	1.0	
73	20x2x2	1.01	20.000	0.100	0.00	PPV	1.1	
74	20x2		20.000					int
75	20x2x2	0.04	20.000	0.000	0.00	PPV	1.0	
76	21x2		20.000					int
Wavenumbers		1000-50		1-0.01		0.000007		

Anexo IV: Cromatograma dos TAG do salmão grelhado inicial e respectivo relatório.



Title : LabLípidos - Área Laboratorial de Nutrição - DITVPP - IPIMAR
 Run File : c:\star\data\sara costa\goodfish - repetição\bioacessivel\salmão grel inic.run
 Method File : C:\star\Met DB WAX_ Junho 2012_GC Arranjado\controlo_qualidade DB-Wax_FRONT_0.8.mth
 Sample ID : salmao grel inic

Injection Date: 16-08-2012 14:37 Calculation Date: 16-08-2012 15:19

Operator : julia Detector Type: 3800 (1 Volt)
 Workstation: Bus Address : 44
 Instrument : GC-3800 Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : Front = FID Run Time : 41.958 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 03133-3790-826-0675 **

Run Mode : Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.01	3.052	0.000	18	BB	1.3	
2		0.01	3.285	0.000	19	BB	1.4	
3	11:0	0.04	4.306	0.003	52	BB	1.7	
4	12:0		4.781					M
5	13:0	0.11	5.427	0.102	161	BB	2.2	
6	14:0 isobr		5.943					M
7	14:0	3.11	6.617	0.003	4575	BB	2.2	
8	15:0 isobr	0.11	7.393	0.008	167	BB	2.4	
9	15:0 ante-is	0.04	7.648	0.010	59	BB	2.3	
10	15:0	0.20	8.180	0.011	301	BB	2.4	
11	16:0 ante-is		9.058					M
12	16:0	9.47	9.984	0.038	13910	BB	3.0	
13	16:1w9	0.04	10.233	0.040	61	BP	2.7	
14		0.21	10.375	0.000	302	PV	3.2	
15	16:1w7	2.98	10.496	0.000	4378	VB	2.7	
16		0.12	10.713	0.000	182	BB	2.5	
17	17:0 isobr.	0.04	10.917	0.018	65	BB	3.2	
18		0.06	11.230	0.000	82	BB	2.5	
19	16:2w4- Fit.	0.27	11.622	0.016	402	BB	3.6	
20	17:0	0.13	11.847	0.026	196	BB	2.7	
21	16:3w4	0.10	12.281	0.015	145	BV	3.2	
22		0.18	12.332	0.000	260	VV	4.0	
23		0.05	12.493	0.000	76	VB	4.6	
24	17:1	0.09	12.806	0.034	131	BV	3.3	
25	16:3w3	0.09	12.921	-0.138	127	VB	2.9	
26	16:4w3	0.11	13.389	0.016	165	BB	2.8	
27	18:0	2.30	13.821	0.049	3376	BB	3.2	
28	18:1w9		14.226					M
29	18:1w7	33.39	14.336	-0.022	49057	BV	4.4	
30		2.83	14.419	0.000	4153	VB	2.5	
31		0.01	14.515	0.000	20	TS	0.0	
32	18:1w5	0.19	14.644	0.041	273	TS	0.0	
33	19:0 isobr	0.06	14.893	0.011	94	BB	2.8	
34	18:2w6	10.16	15.215	0.069	14931	BB	3.3	
35	18:3w6	0.08	15.601	0.039	115	BB	2.5	
36	19:0	0.14	15.837	0.034	203	BB	3.6	
<hr/>								
37		0.03	16.149	0.000	43	BV	3.7	
38	18:3w4	0.10	16.281	0.033	141	VB	3.9	
39	18:3w3	3.86	16.608	0.046	5665	BB	3.4	
40		0.03	17.077	0.000	51	BB	0.0	
41	18:4w3	0.90	17.364	0.029	1316	BB	3.6	
42		0.34	17.696	0.000	505	BB	6.8	
43	20:0	0.28	18.206	0.084	411	BV	3.9	
44	20:1w11		18.626					M
45	20:1w9	0.61	18.704	-0.047	895	VV	5.0	
46		6.46	18.845	0.000	9486	VB	4.3	
47	20:1w7	0.21	19.048	0.067	309	TS	0.0	
48		0.05	19.711	0.000	73	BB	4.7	
49	20:2w6	1.11	20.257	0.069	1630	BB	4.8	
50	21:0	0.22	21.170	0.063	323	BB	5.1	
51	20:4w6	0.19	21.990	0.071	280	BB	5.1	
52	20:3w3	0.50	22.518	0.087	737	BB	5.7	
53	20:4w3	1.34	23.615	0.091	1964	BB	5.9	
54	20:5w3	2.73	24.599	0.022	4017	BB	6.3	
55	22:0	0.13	25.063	0.108	184	BB	7.1	
56	22:1w11		25.675					M
57	22:1w9	5.91	25.857	-0.080	8685	BV	7.5	
58		0.74	26.070	0.000	1094	VB	6.6	
59	21:5w3	0.43	29.756	0.119	625	BB	16.5	
60	23:0		30.050					M
61	22:4w6		31.181					M
62	22:5w6	0.11	33.266	0.133	167	BB	9.6	
63		0.08	34.022	0.000	123	BB	10.2	
64	22:5w3	1.57	35.895	0.186	2313	BB	10.9	
65	24:0		36.664					M
66	22:6w3	5.34	38.120	0.180	7842	BB	13.0	
67	24 :1w9		39.500					M
<hr/>								
Totals:		100.00		1.684	146935			

Anexo V: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos das amostras iniciais do salmão, em valores absolutos

A. Percentagem de gordura da amostra.

Amostra antes da digestão

	%gordura amostra	m(amostra para bioacessibilidade) (g)	m(gordura inicial) (g)
Salmão cru	19,88	1,501	0,298
Salmão Grelhado	24,15	1,525	0,368

A percentagem de gordura livre na amostra inicial do salmão cru e grelhado foi determinada por soxhlet, dado ser o método mais adequado para espécies com um elevado teor lipídico (**dados fornecidos pelo IPMA no âmbito do projeto GOODFISH**).

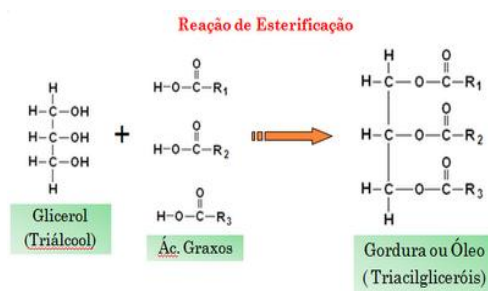
B. Determinação do fator de conversão para o Salmão cru e grelhado.

	TAG	FFA	CL	PL
%	86,18		8,35	5,47
Factor	0,956	1,0	0,0	0,7
Factor inicial		0,863		

% retiradas da TLC analítica.

Fatores tabelados.

Fatores calculado.



		Massa molecular	Massa ajustada TAG
Ác. Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,461	265,455
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	89,0539

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmítico (C16:0)	C16H32O2	256,420	10,16	0,15	239,413	36,159
Oleico (C18:1)	C18H34O2	282,461	35,23	0,52	265,455	139,021
Linoleico (C18:2w6)	C18H32O2	280,000	10,02	0,15	262,993	39,173
Gadoleico (C20:1)	C22H32O2	338,568	6,10	0,09	321,561	29,159
Erúcido (C22:1)	C16H30O2	224,422	5,76	0,09	207,415	17,760
			67,27			
					261,273	Peso molecular médio do ácido gordo estimado
					872,872	Peso molecular do TAG com os ácidos gordos estimados
					834,8392	Peso molecular dos ácidos gordos estimados quando estão livres

C. Esquema para o cálculo da quantidade de ácidos gordos em valor absoluto.

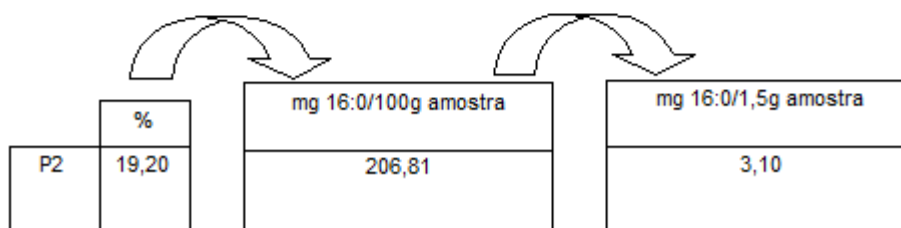
Para a amostra inicial

Tomando como exemplo o C16:0 no salmão cru

Multiplicando por FC*(% gordura na amostra/100)*1000

Multiplicando por 1,5g (massa que se pesou de amostra inicial)/100

$$19,20 * 0,704 * (1,53/100) * 1000$$



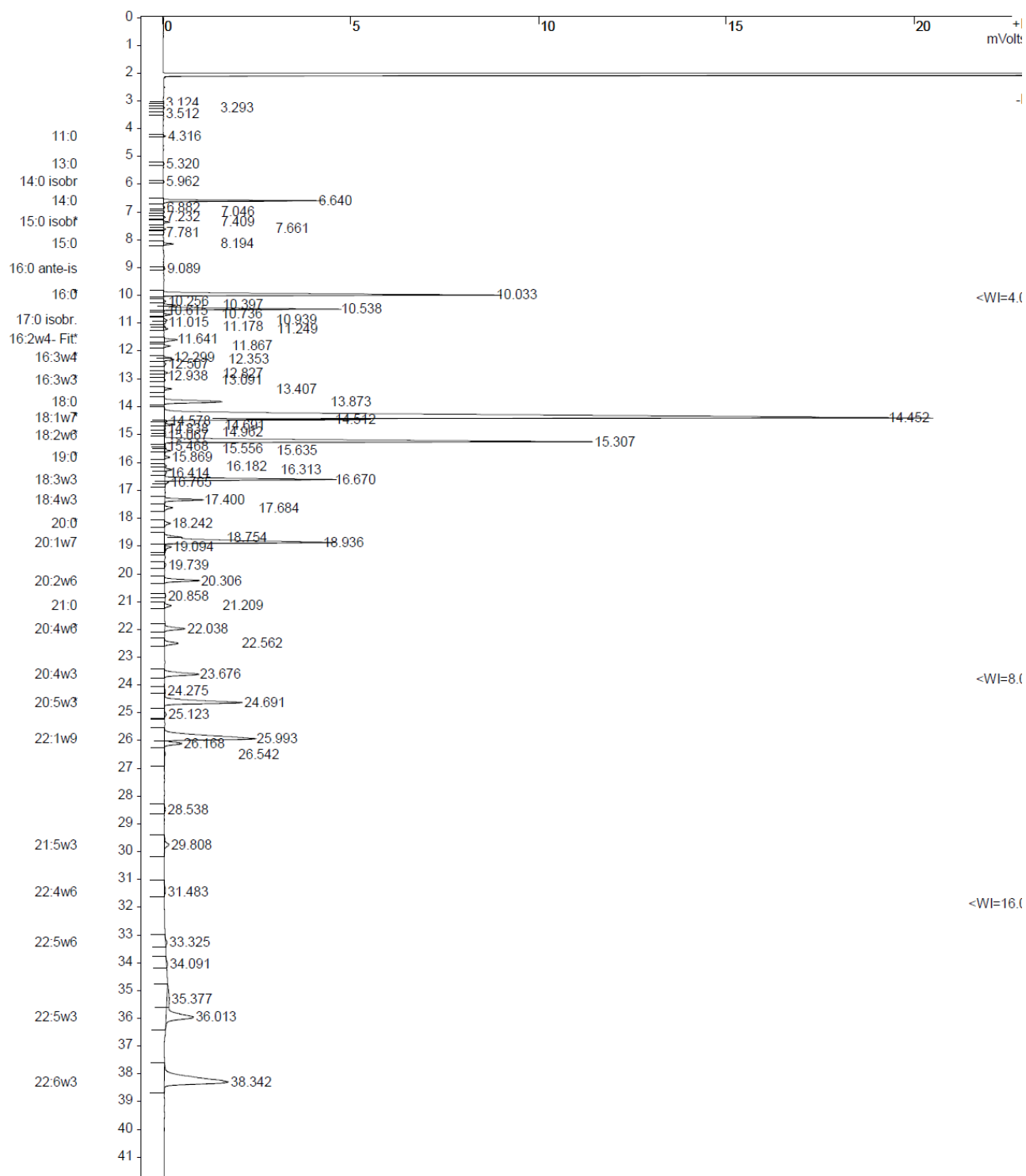
C. Tabelas com todos os cálculos para obtenção dos ácidos gordos em valor absoluto.

Factor corretivo	0,864
%gordura	19,88

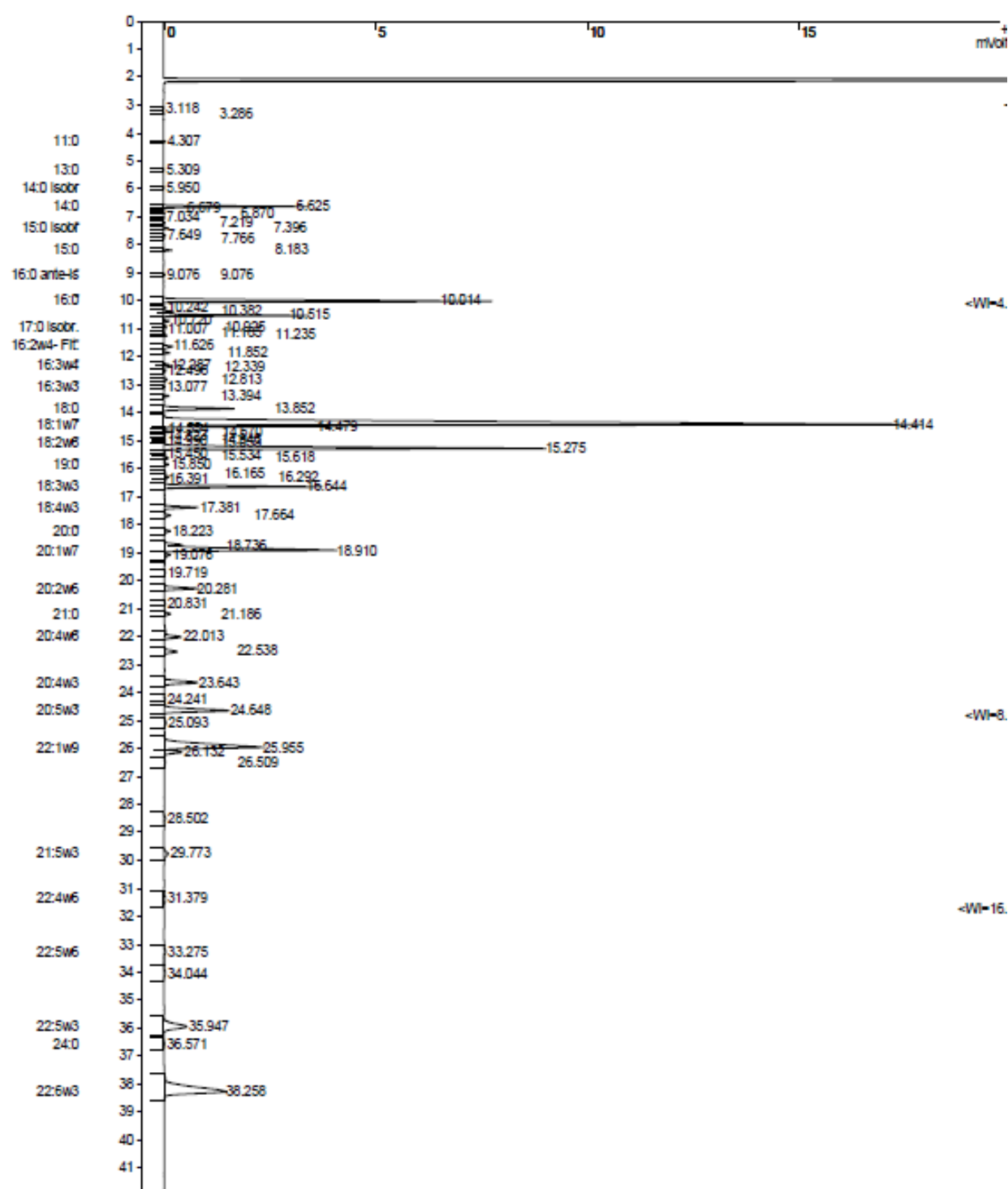
Factor corretivo	0,864
%gordura	24,15

	Salmão cru				Salmão grelhado		
	% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g		% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g
Total	99,18	15309,21	229,64	Total	96,98	20235,46	303,53
Não identificados	0,25	31,31	0,47	Não identificados	0,00	0,00	0,00
Saturados	17,82	3088,69	46,33	Saturados	16,32	3405,27	51,08
Σ14:0	3,53	606,83	9,10	Σ14:0	3,11	648,92	9,73
Σ16:0	10,63	1826,14	27,39	Σ16:0	9,47	1975,97	29,64
Σ18:0	2,36	405,37	6,08	Σ18:0	2,30	479,91	7,20
Monoinsaturados	49,25	7897,96	118,47	Monoinsaturados	53,23	11106,76	166,60
Σ16:1	3,60	619,06	9,29	Σ16:1	2,98	621,79	9,33
Σ18:1	34,90	5988,58	89,83	Σ18:1	36,23	7559,61	113,39
Σ20:1	5,90	874,28	13,11	Σ20:1	7,28	1519,02	22,79
Σ22:1	4,67	386,11	5,79	Σ22:1	6,65	1387,56	20,81
Polinsaturados	31,86	4291,25	64,37	Polinsaturados	27,43	5723,43	85,85
18:2ω6	10,52	1537,64	23,06	18:2ω6	10,16	2119,94	31,80
18:4ω3	0,97	140,92	2,11	18:4ω3	0,90	187,79	2,82
20:5ω3	3,63	558,58	8,38	20:5ω3	2,73	569,63	8,54
22:5ω3	1,73	156,99	2,35	22:5ω3	0,00	0,00	0,00
22:6ω3	6,29	560,92	8,41	22:6ω3	5,34	1114,22	16,71
EPA+DHA	9,92	1119,49	16,79	EPA+DHA	8,07	1683,85	25,26
ΣÓmega 3	19,18	2385,81	35,79	ΣÓmega 3	15,30	3192,44	47,89
ΣÓmega 6	12,03	1753,24	26,30	ΣÓmega 6	11,65	2430,84	36,46
ω3/ω6	1,59	1,47	1,47	ω3/ω6	1,31	1,31	1,31

Anexo VI: Cromatograma do bioacessível do salmão cru e respetivo relatório.



Anexo VII: Cromatograma do bioacessível do salmão grelhado e respectivo relatório.



Title : Lipídios - Área Laboratorial de Nutrição - GCTVFF - IFRR
 Run File : c:\cham\data\data_monta\goodfile - capetipdo\biocombustivel\salmon.gral bin.com
 Method File : C:\cham\Ham DB_8000_Jacks 2012_GC Arranjado\montaria_qualidade DB-Ham_FROST_D.B.mth
 Sample ID : salmon.gral bin

Injection Date: 16-08-2012 18:31 Calculation Date: 16-08-2012 18:03

Operator : julia Detector Type: 8800 (1 Vals)
 Workstation: Bus Address : 44
 Instrument: GC-8800 Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : FROST = FID Run Time : 41.988 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 03133-3790-826-0876 **

Run Mode : Realtime
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Area (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Seg. Code	Width 1/2 (mm)	Status Codes
1		0.01	3.118	0.000	39	BP	1.4	
2		0.01	3.288	0.000	43	PP	1.3	
3 11+0		0.03	4.307	0.004	98	BB	1.7	
4 12+0			4.781					
5 13+0		0.01	5.309	-0.016	48	BB	2.1	
6 14+0 Jacker		0.01	5.950	0.007	49	BB	2.2	
7 14+0		0.33	5.928	0.011	8441	BB	2.3	
8		0.01	6.678	0.000	29	TS	0.0	
9		0.02	6.670	0.000	82	BB	2.5	
10		0.01	7.036	0.000	40	BB	2.2	
11		0.03	7.218	0.009	108	BB	2.3	
12 18+0 Jacker		0.03	7.398	0.011	317	BB	2.4	
13 18+0 asteria		0.04	7.449	0.012	128	BB	2.5	
14		0.02	7.746	0.000	55	BB	2.5	
15 18+0		0.14	8.183	0.014	872	BB	2.4	
16 18+0 asteria		0.02	8.076	0.019	59	BB	2.0	
17 18+0		7.74	10.016	0.068	28031	BB	3.4	
18 18+0		0.04	10.242	0.049	138	BV	2.7	
19		0.27	10.382	0.000	681	VV	3.2	
20 18+0		3.80	10.818	0.019	10190	VV	3.7	
21		0.11	10.720	0.000	392	TS	0.0	
22 17+0 Jacker.		0.08	10.928	0.026	306	PV	0.0	
23		0.08	11.007	0.000	182	VV	0.0	
24		0.02	11.168	0.000	70	VV	0.0	
25		0.07	11.238	0.000	266	VN	0.0	
26 18+0		0.27	11.628	0.020	886	BV	4.0	
27 17+0		0.13	11.882	0.031	486	VN	3.8	
28 18+0		0.10	12.287	0.021	354	BV	3.4	
29		0.18	12.338	0.000	691	VV	3.9	
30		0.08	12.498	0.000	183	VN	4.8	
31 17+1		0.08	12.818	0.041	272	BB	3.2	
32 18+0		0.02	13.077	0.018	88	BB	2.8	
33 18+0		0.11	13.394	0.021	413	BB	3.0	
34 18+0		2.17	13.882	0.079	7882	BB	4.8	
35 18+0			14.228					
36 18+0		33.28	14.414	0.086	120461	BV	6.4	
37		2.81	14.678	0.000	10183	VV	2.8	
38 18+0		0.01	14.884	-0.049	51	TS	0.0	
39		0.18	14.870	0.000	439	TS	0.0	
40 18+0 Jacker		0.02	14.823	-0.059	58	TS	0.0	
41		0.01	14.848	0.000	44	TF	0.0	
42		0.01	14.890	0.000	49	TF	0.0	
43 18+0		0.02	15.083	-0.093	80	TF	0.0	
44		11.13	15.278	0.000	40286	VN	4.2	
45		0.01	15.480	0.000	48	TF	0.0	
46 18+0		0.02	15.834	-0.028	81	TF	0.0	
47		0.10	16.428	0.000	348	TF	0.0	
48 18+0		0.11	16.880	0.047	592	TS	0.0	
49		0.04	16.148	0.000	160	BV	3.7	
50 18+0		0.18	16.282	0.044	827	VV	3.9	
51		0.07	16.391	0.000	241	VV	0.0	
52 18+0		1.90	16.846	0.082	14100	VN	3.5	
53 18+0		0.89	17.381	0.046	3236	BV	3.8	
54		0.18	17.484	0.000	447	VN	3.8	
55 20+0		0.21	18.223	0.101	774	BB	4.4	
56 20+0			18.404					
57 20+0		0.54	18.734	-0.018	1973	BV	4.8	
58 20+0		6.48	18.810	-0.072	23388	VN	5.3	
59		0.20	19.074	0.000	820	TS	0.0	
60		0.04	19.719	0.000	138	BB	4.5	
61 20+0		1.13	20.281	0.094	4097	BB	4.7	
62		0.03	20.831	0.000	119	BB	5.3	
63 21+0		0.20	21.184	0.079	759	BB	5.0	
64 20+0		0.40	22.013	0.094	2048	BB	5.3	
65 20+0		0.83	22.838	0.107	1908	BB	5.7	
66 20+0		1.44	23.443	0.120	5216	BB	6.1	
67		0.03	24.241	0.000	97	BB	0.0	
68 20+0		2.96	24.648	0.071	10703	BB	6.8	
69 22+0		0.10	25.063	0.138	344	BB	7.4	
70 22+0			25.875					
71 22+0		6.08	25.885	0.019	21887	BV	8.6	
72		0.74	26.132	0.000	2688	VN	6.2	
73		0.08	26.809	0.000	189	BB	7.2	
74		0.07	28.802	0.000	255	BB	8.0	
75 21+0		0.24	29.773	0.138	878	BB	9.0	
76 23+0			30.080					
77 22+0		0.13	31.379	0.198	478	BB	16.9	
78 22+0		0.11	33.275	0.142	404	BV	9.8	
79		0.10	34.046	0.000	393	VN	10.4	
80 22+0		3.77	35.947	0.238	8208	BB	11.1	
81 34+0		0.04	36.871	-0.093	140	BB	11.1	
82 22+0		6.11	38.288	0.318	22089	BB	14.3	
83 24+0			39.800					
Totals:		100.01		2.178	361939			

Anexo VIII: Perfil de ácidos gordos da solução de enzimas utilizada no ensaio de bioacessibilidade.

	Solução de enzimas
	% cromatograma
<i>Total</i>	97,71
Não identificados	0,91
Saturados	27,66
Σ14:0	0,41
Σ15:0	0,27
Σ16:0	16,69
Σ18:0	8,68
Σ20:0	0,39
Monoinsaturados	24,81
Σ16:1	1,02
Σ18:1	23,56
Polinsaturados	44,33
Σ16:3	0,24
18:2ω6	27,19
Σ18:3	0,17
Σ20:2	0,29
Σ20:4	13,93
22:5ω3	1,41
22:6ω3	1,10
EPA+DHA	1,10
ΣÓmega 3	2,51
ΣÓmega 6	41,58
ω3/ω6	0,06

Ao analisar o perfil de ácidos gordos desta solução de enzimas, verificamos que esta tem um contributo significativo no bioacessível das amostras em estudo, principalmente nos ácidos gordos 16:0, 18:1 e 18:2ω6, que são os mais representativos nesta solução.

No entanto, apenas foi realizada esta análise, devido à limitação de tempo, mas é aconselhável fazer várias repetições para averiguar um valor médio.

Anexo IX: Ajuste dos teores de gordura nas amostras de bioacessível do salmão.

A. Massa de gordura na solução de enzimas.

	Vol. Bioacessível (mL)	m gordura (g)	m bioacessível (g)	m gordura (usando o peso) (g)*
Branco (sol. Enzimas)	22	0,0135	25,55	0,0157

*A massa de gordura presente no branco foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Massa de gordura (g)} = \frac{\text{massa bioacessível (g)} \times \text{massa gordura (g)}}{\text{Vol. bioacessível (mL)}}$$

B. Percentagem de gordura nas amostras.

	Vol. Bioac. usado na extração (ml)	m gordura (g)	m gordura corrigida (g)	% Gordura no vol. Extraído	m bioac. (g)	m gordura no bioacessível total corrigida (g)
Salmão cru	8,00	0,05	0,04	0,53	27,53	0,15
Salmão grelhado	10,00	0,07	0,07	0,63	26,55	0,17

- **Massa de gordura corrigida (g) =**

$$\frac{\text{massa gordura (g)} - (\text{Vol. bioac usado na extração} \times \text{massa gordura do branco})}{\text{Vol. bioac. branco}}$$

- **% gordura extraída =** $\frac{\text{massa gordura corrigida (g)}}{\text{Vol. Bioac (mL)}} \times 100$.

- **Massa gordura corrigida no bioacessível (g) =** $\frac{\text{massa bioacessível (g)} \times \text{massa corrigida (g)}}{\text{Vol. bioacessível (mL)}}$.

Anexo X: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos dos bioacessíveis do salmão, em valores absolutos

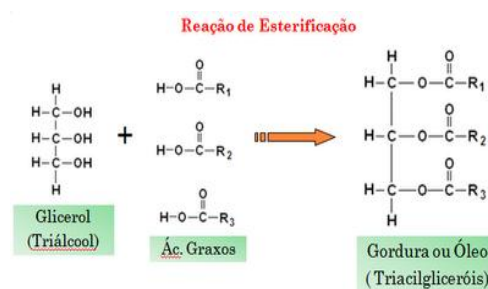
A. Determinação do fator de conversão do bioacessível do salmão cru e grelhado.

	FFA	CL	DAG	MAG	PL
%	76,18	7,89	2,38	8,07	5,48
Factor	1,0	0,0	0,91	0,81	0,7
Factor inicial			0,887		

% retiradas da TLC analítica.

Fatores tabelados.

Fatores calculado.



		Massa molecular	Massa ajustada Inicial
glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	89,05

Ácidos gordos na forma livre

		Massa Molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmítico (C16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,42	7,36	0,11	239,41	25,93
Oleíco (C18:1)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,46	36,68	0,54	265,46	143,27
Linoleíco (C18:2w6)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,00	11,5	0,17	262,99	44,50
Gadoleíco (C20:1)	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	338,57	6,47	0,10	321,56	30,61
Erúcico (C22:1)	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	224,42	5,95	0,09	207,42	18,16
			67,96			262,48
						876,49
						838,45

		Massa molecular	Massa ajustada DAG+CL
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	90,06

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmítico (C16:0)	C16H32O2	256,42	32,29	0,36	239,41	86,65
Oleico (C18:1)	C18H34O2	282,46	3,66	0,04	265,46	10,89
Mirístico (C14:0)	C14H28O2	228,37	20,79	0,23	211,36	49,25
Esterárico (C18:0)	C18H36O2	284,48	18,22	0,20	267,47	54,62
docosapentaenoico (C22:5w6)	C22H44O2	340,58	14,26	0,16	323,57	51,72
			89,22			
						253,13
						596,31
						540,27

		Massa molecular	Massa ajustada
			MAG
Glicerol	C3H8O3	92,078	91,07

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmítico (C16:0)	C16H32O2	256,42	10,92	0,14	239,41	33,83
Mirístico (C14:0)	C14H28O2	228,37	3,67	0,05	211,36	10,04
Estearidônico (C18:4)	C18H28O2	276,40	5,16	0,07	259,39	17,32
Araquidônico (C20:4)	C20H32O2	304,46	4,74	0,06	287,45	17,63
docosapentaenoico (C22:5w6)	C22H44O2	340,58	52,8	0,68	323,57	221,05
			77,29			
						299,85
						390,92
						316,86

B. Esquema para o cálculo da quantidade de ácidos gordos em valor absoluto no bioacessível.

Para o bioacessível

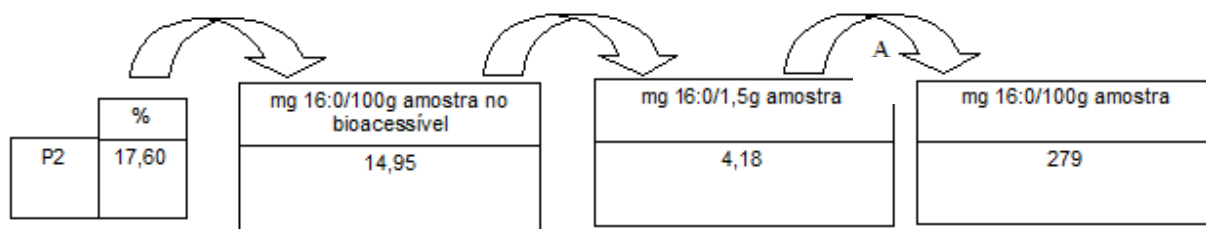
Tomando como exemplo o C16:0

Multiplicando por FC*(% gordura
que fica na amostra/100)*1000

$$17,60 * 0,772 * (0,11/100) * 1000$$

Multiplicando por 28/100, conver-
tendo para a amostra inicial

Multiplicando por 100/1,5
convertendo para 100 amostra



C. Tabelas com todos os cálculos para obtenção dos ácidos gordos em valor absoluto.

Factor corretivo %gordura					Factor corretivo %gordura				
0,887 0,53					0,887 0,63				
	Bioacessível Salmão cru					Bioacessível Salmão grelhado			
	% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g	mg/ 100 g		% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g	mg/100 g
Total	98,25	461,88	129,33	8621,82	Total	98,63	551,15	154,32	10778,13
Não identific ados	0,00	0,00	0,00	0,00	Não identific ados	53,36	298,18	83,49	5831,10
Saturad os	12,92	60,74	17,01	1133,78	Saturad os	13,47	75,27	21,08	1471,98
Σ14:0	2,46	11,56	3,24	215,87	Σ14:0	2,35	13,13	3,68	256,80
Σ16:0	7,36	34,60	9,69	645,87	Σ16:0	7,79	43,53	12,19	851,28
Σ18:0	1,95	9,17	2,57	171,12	Σ18:0	2,18	12,18	3,41	238,23
Monoin saturad os	52,37	246,20	68,94	4595,67	Monoin aturados	53,36	298,18	83,49	5831,10
Σ16:1	3,20	15,04	4,21	280,81	Σ16:1	2,80	15,65	4,38	305,98
Σ18:1	36,68	172,44	48,28	3218,81	Σ18:1	36,39	203,35	56,94	3976,64
Σ20:1	6,47	30,42	8,52	567,77	Σ20:1	7,27	40,63	11,38	794,45
Σ22:1	5,95	27,97	7,83	522,14	Σ22:1	6,82	38,11	10,67	745,28
Polinsat urados	32,96	154,95	43,39	2892,37	Polinsat urados	31,80	177,70	49,76	3475,05
18:2ω6	11,50	54,06	15,14	1009,17	18:2ω6	11,07	61,86	17,32	1209,71
18:4ω3	0,91	4,28	1,20	79,86	18:4ω3	0,88	4,92	1,38	96,16
20:5ω3	3,35	15,75	4,41	293,98	20:5ω3	2,97	16,60	4,65	324,56
22:5ω3	2,25	10,58	2,96	197,45	22:5ω3	1,78	9,95	2,79	194,52
22:6ω3	5,90	27,74	7,77	517,75	22:6ω3	6,14	34,31	9,61	670,97
EPA+DH A	9,25	43,49	12,18	811,72	EPA+DH A	9,11	50,91	14,25	995,53
ΣÓmega 3	18,83	88,52	24,79	1652,41	ΣÓmega 3	18,02	100,70	28,20	1969,20
ΣÓmega 6	13,43	63,14	17,68	1178,53	ΣÓmega 6	13,16	73,54	20,59	1438,10
ω3/ω6	1,40	1,40	1,40	93,47	ω3/ω6	1,37	1,37	1,37	91,29

Anexo XI: Metodologia para determinação da gordura total: SMEDES

O Bligh & Dyer foi um método padrão adotado para a determinação de lípidos totais em organismos marinhos, em que se utiliza como solventes o metanol e clorofórmio. Dado ao efeito adverso no ambiente dos solventes clorados o uso de clorofórmio é fortemente desencorajado.

A extração via método de *Soxhlet* pode ser efetuada facilmente sem o recurso a solventes clorados, no entanto os resultados são frequentemente menores que os obtidos pelo Bligh & Dyer e considerando-se que o método não extrai os lípidos totais (permanecendo a fração de lípidos que se encontra “ligada” à amostra) mas sim os lípidos “extratáveis”.

Posteriormente verificou-se que o rendimento do método dependia de fatores como a composição do solvente e o tempo de extração ou, mais precisamente, o número de ciclos. Sendo os resultados do método de *Soxhlet* fortemente dependentes de fatores operacionais, torna-se difícil controlar as condições de extração. Assim, foi desenvolvido um novo método, a partir do Bligh & Dyer, que recorre a um solvente polar (dado este ser um pré-requisito para se obter uma extração eficiente) não clorado e de baixa toxicidade – Método de *Smedes*.

O *Smedes* é o método de Bligh & Dyer modificado, em que no procedimento o metanol é substituído por Isopropanol (2-propanol) e o clorofórmio (CHCl_3) por ciclohexano. Uma vantagem do ciclohexano sobre o clorofórmio é a sua baixa densidade, separando-se na camada superior na mistura de extração. Uma mistura de água: 2-propanol:ciclohexano (11:8:10) é usada como solvente, seguida de uma segunda extração com 20 mL (a 10%) de 2-propanol em ciclohexano. Após centrifugação, a fase com ciclohexano é adicionada ao primeiro extrato. Após evaporação, o resíduo é seco a 104 °C durante 1h.

Os solventes usados para a extração de lípidos devem ter uma elevada solubilidade para todos os componentes e ser suficientemente polar para remove-los do local de ligação nas membranas celulares, lipoproteínas e glicolípidos.

Para determinação do teor de gordura, primeiramente determina-se o teor de humidade da amostra e pesam-se as peras que serão utilizadas no ensaio. Depois pesa-se uma porção de amostra tal que não tenha mais de 1 g de lípidos ou 8 g de água.

Para a porção de amostra pesada, adicionar 18 mL de isopropanol p.a. e 20 mL de ciclohexano p.a, homogeneizando no Ultra-Turrax durante 2 minutos. Adicionar **W** mL de água, calculado da seguinte forma:

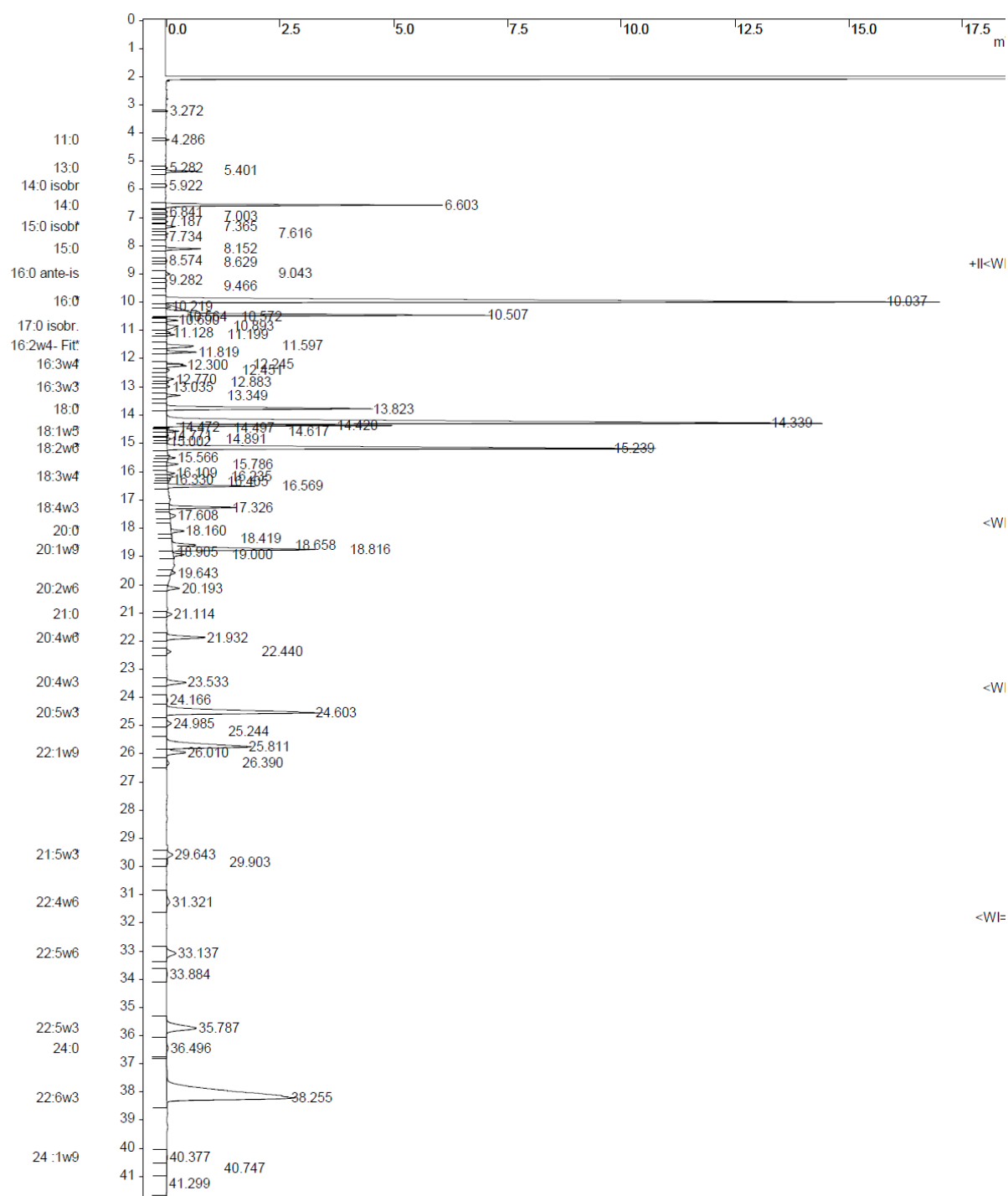
$$W = 22 - \frac{\text{amostra (g)} \times \text{humidade}(\%)}{100}$$

Voltar a homogeneizar durante 1 minutos e de seguida, centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm e à temperatura ambiente. Transferir a fase orgânica (fase superior) para uma pêra de evaporação, podendo a amostra ser filtrada através de uma coluna de vidro com 2 cm de algodão de lã no seu interior. Adicionar 20 mL de uma solução ciclohexano, contendo 13% de isopropanol, à amostra para fazer uma segunda extração. Homogeneizar, centrifugar novamente e transferir o máximo de fase orgânica para a Pêra/ampola de decantação contendo o primeiro extrato.

Por fim, evaporar o solvente em evaporador rotativo e levar a pêra a secar a 105 °C durante 1 hora. Peser após arrefecimento e calcular o teor de gordura através da fórmula:

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{m(\text{pêra} + \text{gordura})(g) - m(\text{pêra})(g)}{m(\text{amostra})(g)} \times 100$$

Anexo XII: Cromatograma dos TAG da corvina crua inicial e respectivo relatório.



Print Date: Thu Sep 20 14:24:27 2012

Page 1 of 2

Title : LabLípidos - Área Laboratorial de Nutrição - DITVPP - IPIMAR
Run File : c:\star\data\sara costa\tlcs\bioacessível injectado pela julia\sara 8
Method File : sara 8-front.mth
Sample ID : sara 8

Injection Date: 12-09-2012 5:22 Calculation Date: 20-09-2012 14:21

Operator : julia Detector Type: 3800 (1 Volt)
Workstation: Bus Address : 44
Instrument : GC-3800 Sample Rate : 10.00 Hz
Channel : Front = FID Run Time : 41.958 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 03133-3790-826-0675 **

Run Mode : Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent

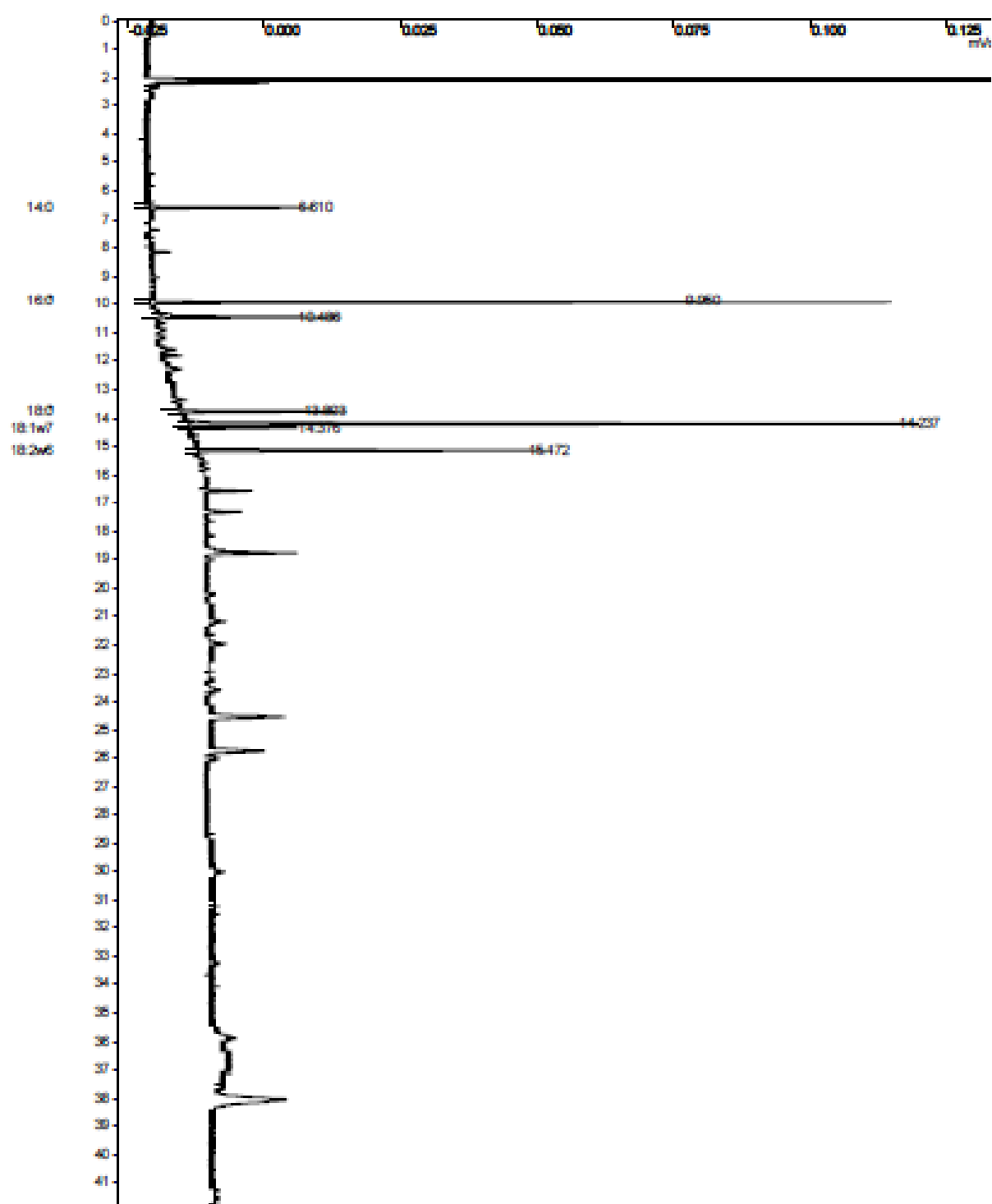
Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.01	3.272	0.000	57	BB	1.7	
2	12:0	0.03	4.286	-0.017	169	BB	1.8	
3	13:0	0.02	5.282	-0.043	113	BV	2.3	
4	14:0 isobr	0.36	5.401	0.000	1752	VB	2.3	
5	14:0	0.02	5.922	-0.021	83	BB	2.3	
6	14:0	3.61	6.603	-0.010	17824	BB	2.6	
7	14:0	0.02	6.841	0.000	86	BB	3.0	
8	14:0	0.02	7.003	0.000	97	BB	2.5	
9	15:0 isobr	0.13	7.187	0.000	119	BB	2.5	
10	15:0 ante-is	0.03	7.365	-0.020	657	BB	2.7	
11	15:0	0.02	7.616	-0.021	163	BV	2.7	
12	15:0	0.02	7.734	0.000	106	VB	2.9	
13	15:0	0.49	8.152	-0.017	2406	BB	2.9	
14	16:0 ante-is	0.03	8.574	0.000	129	BV	3.4	
15	16:0	0.01	8.629	0.000	239	VB	6.3	
16	16:0	0.08	9.043	-0.015	408	BP	3.5	
17	16:0	0.03	9.282	0.000	124	PV	4.8	
18	16:0	0.02	9.466	0.000	97	VB	6.4	
19	16:0	18.00	10.037	0.091	88803	BV	0.0	
20	16:1w9	0.06	10.219	0.026	291	TF	0.0	
21	16:1w7	0.01	10.564	0.000	25877	VV	0.0	
22	16:1w7	0.00	10.572	0.000	62	VB	3.1	
23	17:0 isobr.	0.15	10.690	0.000	7	TS	0.0	
24	17:0	0.34	10.893	-0.006	756	TF	0.0	
25	17:0	0.06	11.188	0.000	1335	TF	0.0	
26	16:2w4- Fit.	0.12	11.199	0.000	604	TF	0.0	
27	17:0	0.68	11.597	-0.009	3331	BV	5.4	
28	17:0	0.44	11.819	-0.002	2180	VB	3.0	
29	16:3w4	0.23	12.245	-0.021	1117	BV	3.4	
30	17:1	0.06	12.349	-0.024	154	VV	4.4	
31	17:1	0.13	12.451	0.000	309	VB	4.6	
32	17:1	0.03	12.770	-0.002	651	BV	3.7	
33	16:3w3	0.03	12.883	0.000	145	VV	3.1	
34	16:4w3	0.06	13.035	-0.024	273	VB	2.9	
35	18:0	0.21	13.349	-0.024	1040	BB	3.0	
36	18:0	4.07	13.823	0.050	20088	BP	4.3	
37	18:1w9	17.42	14.226	-0.019	85956	PV	5.8	
38	18:1w7	2.68	14.339	0.000	13209	VV	0.0	
39	18:1w7	0.08	14.420	0.000	372	VB	0.0	
40	18:1w5	0.01	14.497	0.000	69	TS	0.0	
41	18:1w5	0.15	14.617	0.014	750	TS	0.0	
42	19:0 isobr	0.02	14.771	0.000	119	TS	0.0	
43	19:0	0.07	14.891	0.009	329	TF	0.0	
44	18:2w6	0.01	15.012	0.000	68	TF	0.0	
45	18:3w6	10.49	15.239	0.093	51727	PB	4.7	
46	19:0	0.09	15.566	0.004	449	BB	2.6	
47	18:3w4	0.21	15.786	-0.017	1013	BB	3.9	
48	18:3w4	0.13	16.109	0.000	643	BV	3.4	
49	18:3w4	0.13	16.235	-0.013	629	VV	4.8	
50	18:3w4	0.06	16.330	0.000	283	VV	5.6	
51	18:3w3	0.02	16.405	0.000	75	VV	5.8	
52	18:4w3	1.39	16.569	0.007	6843	VB	3.4	
53	20:0	1.21	17.326	-0.009	5954	BB	3.8	
54	20:0	0.17	17.608	0.000	826	BB	6.7	
55	20:0	0.28	18.160	0.038	1401	BV	4.5	
56	20:1w11	0.02	18.419	0.000	115	VV	0.0	
57	20:1w9	0.56	18.658	0.032	2752	VV	6.1	
58	20:1w7	3.47	18.816	0.065	17101	VV	0.0	
59	20:1w7	0.00	18.905	0.000	0	VP	5.1	
60	20:2w6	0.24	19.000	0.019	1168	PB	0.0	
61	21:0	0.08	19.643	0.000	399	BB	3.8	
62	20:4w6	0.27	20.193	0.006	1321	BB	4.5	
63	20:4w6	0.13	21.114	0.007	644	BB	5.9	
64	20:3w3	1.02	21.932	0.013	5021	BB	5.5	
65	20:4w3	0.11	22.440	0.009	561	BB	5.6	
66	20:4w3	0.59	23.533	0.010	2909	BB	6.2	
67	20:5w3	0.06	24.166	0.000	277	BV	7.9	
68	22:0	5.42	24.603	0.026	26730	VV	7.3	
69	22:0	0.16	25.244	0.030	765	TF	0.0	
70	22:0	0.01	25.244	0.000	63	TF	0.0	

Print Date: Thu Sep 20 14:24:27 2012

Page 2 of 2

81	22:5w6	0.45	33.137	0.004	2205	BB	9.9	
82		0.05	33.884	0.000	256	BB	9.9	
83	22:5w3	1.63	35.787	0.078	8023	BP	11.4	
84	24:0	0.10	36.496	-0.168	499	TS	0.0	
85	22:6w3	11.24	38.255	0.315	55450	PB	18.7	
86	24:1w9	0.03	40.377	0.877	147	BV	11.5	
87		0.02	40.747	0.000	107	VV	11.6	
88		0.04	41.299	0.000	210	VB	17.9	
Totals:		100.03		1.429	493293			

Anexo XIII: Cromatograma dos TAG da corvina grelhada inicial e respectivo relatório.



Title : Leblipides - Area Laboratorial da Nutrição - CCTVFP - IFRR
 Run File : c:\lehar\data\data_marta\goodfish - rapachigão\binomomomival\servino.gral tag p3001.run
 Method File : C:\lehar\Met 08.MET_ Junho 2012_GC Arranjado\metrolis_qualidade 08-Met_FRONT_0.8.mh
 Sample ID : servino.gral TAG p3

Injection Date: 17-08-2012 16:01 Calculation Date: 17-08-2012 16:43

Operator : Julia Detector Type: 3800 (1 Volts)
 Workstation: Run Address : 44
 Instrument: GC-3800 Sample Size : 10.00 µl
 Channel : Front - FID Run Time : 41.888 min

** GC Workstation Version 4.20 ** 03133-3790-828-0478 **

Run Mode : Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sp. Code	Width (sec)	Status Codes
1	11:0		6.303					H
2	12:0		6.781					H
3	13:0		8.338					H
4	14:0 Isobar		8.843					H
5	14:0	5.74	8.850	-0.004	78	BB	3.3	
6	15:0 Isobar		7.388					H
7	15:0 ante-1a		7.837					H
8	15:0		8.189					H
9	16:0 ante-1a		8.588					H
10	16:0	26.38	8.880	0.004	373	BB	3.3	
11	16:1w8		10.103					H
12	16:1w7	7.41	10.686	-0.010	97	BB	3.7	
13	17:0 Isobar		10.899					H
14	16:2w2- Fib.		11.806					H
15	17:0		11.831					H
16	16:3w4		12.268					H
17	17:1		12.772					H
18	16:3w3		13.089					H
19	16:4w3		13.373					H
20	18:0	7.18	13.803	0.030	94	BB	3.0	
21	18:1w8	31.28	14.237	0.031	410	BB	3.0	
22	18:1w7	4.44	14.376	0.038	58	BB	3.0	
23	18:1w8		14.803					H
24	19:0 Isobar		14.880					H
25	18:2w6	18.40	15.170	0.036	208	BB	3.0	
26	18:3w6		15.860					H
27	19:0		16.803					H
28	18:3w4		16.268					H
29	18:3w3		16.860					H
30	18:4w3		17.338					H
31	20:0		18.120					H
32	20:1w11		18.626					H
33	20:1w8		18.781					H
34	20:1w7		18.881					H
35	20:2w6		20.187					H
36	21:0		21.107					H
37	20:4w6		21.919					H
38	20:3w3		22.431					H
39	20:4w3		23.823					H
40	20:5w3		24.877					H
41	22:0		24.988					H
42	22:1w11		25.678					H
43	22:1w8		26.836					H
44	21:8w3		28.837					H
45	23:0		30.080					H
46	22:4w6		31.181					H
47	22:5w6		33.133					H
48	22:8w3		35.709					H
49	24:0		36.864					H
50	22:4w3		37.940					H
51	24:1w8		38.800					H
Totals:		100.00		0.078	1311			

Anexo XIV: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos das amostras iniciais da corvina, em valores absolutos

A. Percentagem de gordura da amostra.

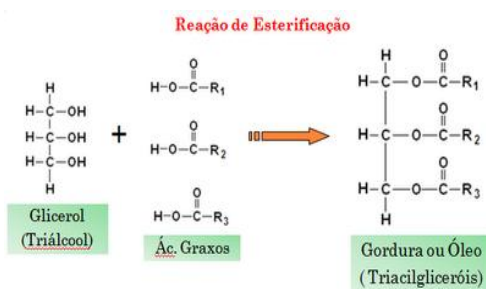
Amostra antes da digestão

	%gordura amostra	m(amostra) bioacessibilidade (g)	m(gordura)inicial (g)
Corvina crua	1,53	1,502	0,023
Corvina grelhada	2,53	1,522	0,038

A percentagem de gordura livre na amostra inicial da corvina crua e grelhada foi determinada por smedes, dado ser o método mais adequado para espécies com baixo teor lipídico (**dados fornecidos pelo IPMA no âmbito do projeto GOODFISH**).

B. Determinação do fator de conversão para a corvina crua e grelhada.

	TAG	FFA	CL	PL	
%	50	16	24	10	% retiradas da TLC analítica.
Factor	0,955	1,0	0,0	0,7	Fatores tabelados.
Factor inicial		0,704			Fator calculado.



	Massa molecular		Massa ajustada
			TAG
Ác. Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,461	265,455
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	89,0539

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmitico (C16:o)	C16H32O2	256,42	18,48	0,32	239,41	76,39
Oléico (C18:1)	C18H34O2	282,46	20,12	0,35	265,46	92,21
Linoleico (C18:2w6)	C18H32O2	280,00	10,71	0,18	262,99	48,63
Esterárico (C18:o)	C18H36O2	284,48	4,39	0,08	267,47	20,27
Palmitoleico (C16:1)	C16H30O2	224,42	4,22	0,07	207,42	15,11
			57,92		252,62	Peso molecular médio do ácido gordo estimado
					846,90	Peso molecular do TAG com os ácidos gordos estimados
					808,86	Peso molecular dos ácidos gordos estimados quando estão livres

(O esquema para o cálculo em valor absoluto dos ácidos gordos já foi apresentado no anexo V)

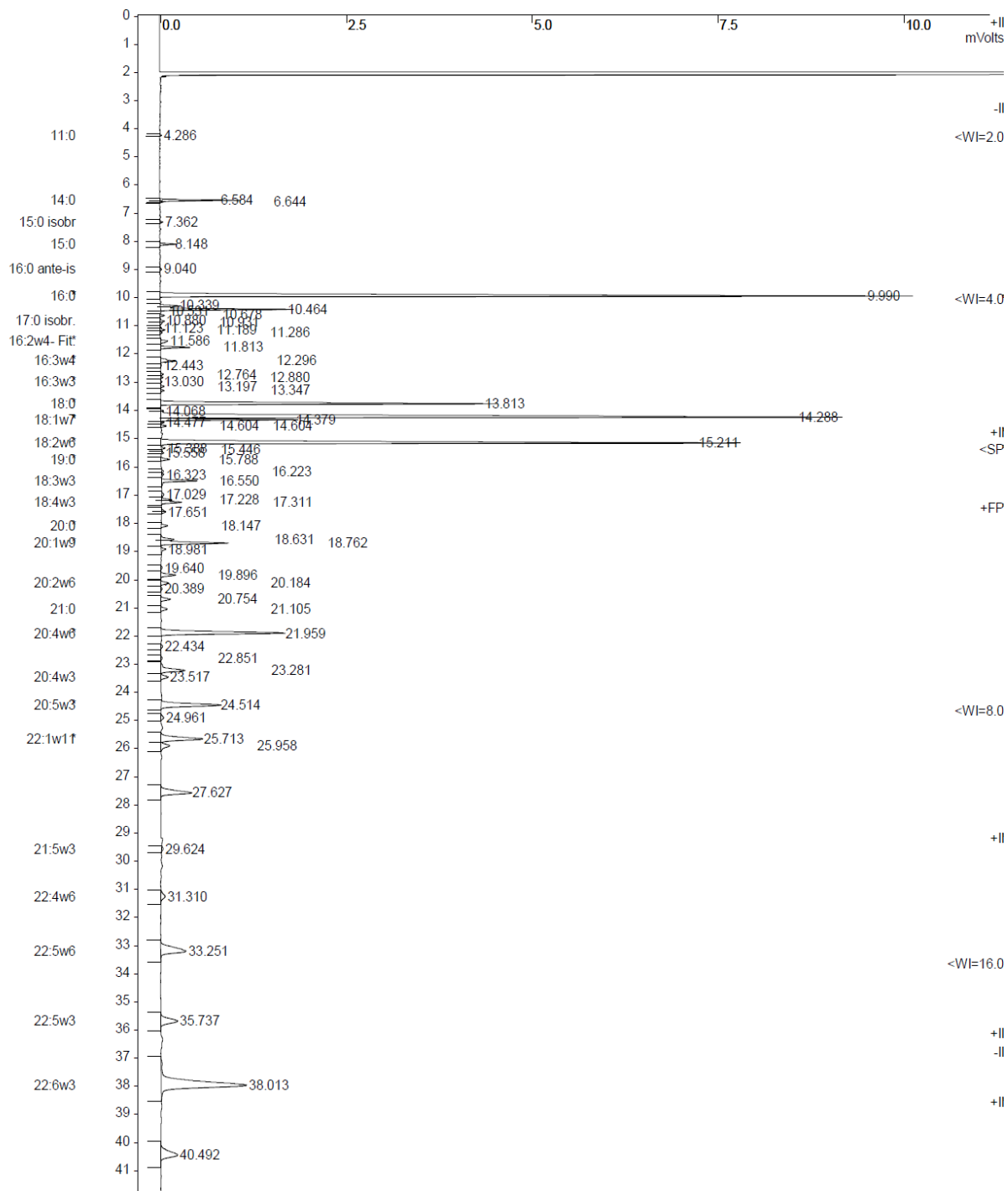
C. Tabelas com todos os cálculos para obtenção dos ácidos gordos em valor absoluto.

Factor corretivo	0,704
%gordura	1,53

Factor corretivo	0,704
%gordura	2,53

Corvina crua				Corvina grelhada			
	% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/1,5 g		% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g
Saturados	29,98	322,87	4,84	Saturados	28,29	503,88	7,56
Σ14:0	2,98	32,04	0,48	Σ14:0	4,10	73,03	1,10
Σ16:0	19,20	206,81	3,10	Σ16:0	18,64	332,00	4,98
Σ18:0	5,63	60,59	0,91	Σ18:0	5,16	91,91	1,38
Monoinsaturados	31,65	340,91	5,11	Monoinsaturados	38,63	688,05	10,32
Σ16:1	4,64	49,98	0,75	Σ16:1	5,13	91,37	1,37
Σ18:1	19,08	205,51	3,08	Σ18:1	25,66	457,04	6,86
Polinsaturados	36,97	398,21	5,97	Polinsaturados	33,07	589,02	8,84
18:2ω6	9,78	105,34	1,58	18:2ω6	12,03	214,27	3,21
20:5ω3	4,59	49,39	0,74	20:5ω3	6,34	112,92	1,69
22:5ω3	1,45	15,62	0,23	22:5ω3	0,00	0,00	0,00
22:6ω3	14,42	155,32	2,33	22:6ω3	9,14	162,79	2,44
EPA+DHA	19,01	204,71	3,07	EPA+DHA	15,48	275,72	4,14
ΣÓmega 3	23,69	255,17	3,83	ΣÓmega 3	18,26	325,23	4,88
ΣÓmega 6	12,33	132,81	1,99	ΣÓmega 6	14,81	263,78	3,96
ω3/ω6	1,92	1,92	1,92	ω3/ω6	1,23	1,23	1,23
Total	98,83	1063,76	15,96	Total	99,99	1780,94	26,71

Anexo XV: Cromatograma do bioacessível da corvina crua e respetivo relatório.



Print Date: Thu Sep 20 14:03:45 2012

Page 1 of 2

Title : LabLípidos - Área Laboratorial de Nutrição - DITVPP - IPIMAR
Run File : c:\star\data\sara costa\tlcs\biocessível injectado pela julia\sara 5.run
Method File : sara 5-front.mth
Sample ID : sara 5

Injection Date: 12-09-2012 2:26 Calculation Date: 20-09-2012 14:01

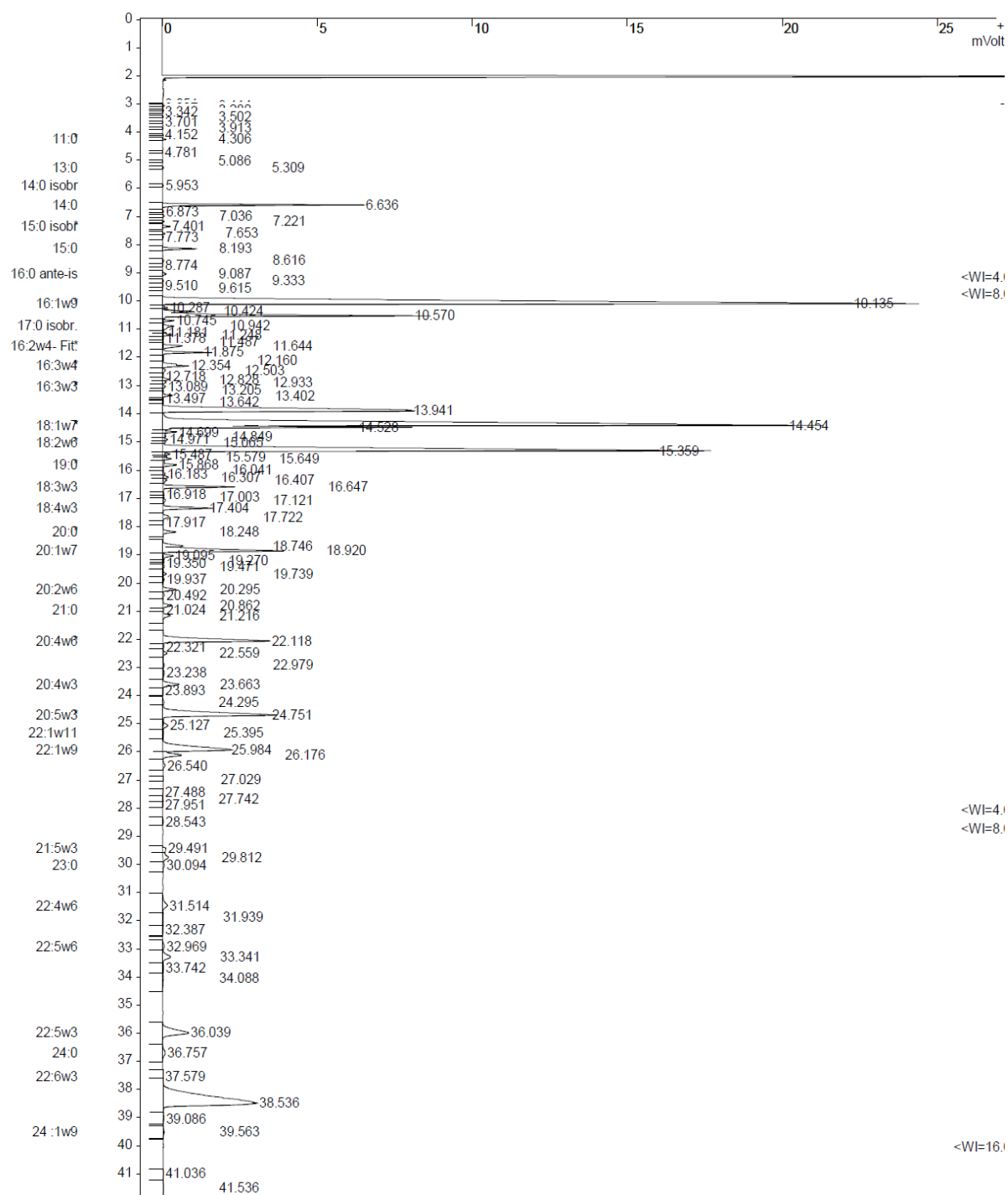
Operator : julia Detector Type: 3800 (1 Volt)
Workstation: Bus Address : 44
Instrument : GC-3800 Sample Rate : 10.00 Hz
Channel : Front = FID Run Time : 41.958 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 03133-3790-826-0675 **

Run Mode : Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1	11:0	0.02	4.286	-0.017	51	BB	1.6	
2	12:0		4.781					M
3	13:0		5.325					M
4	14:0 isobr		5.943					M
5	14:0	1.24	6.584	-0.030	2730	BB	2.3	
6		0.01	6.644	0.000	18	TS	0.0	
7	15:0 isobr	0.06	7.362	-0.023	124	BB	2.4	
8	15:0 ante-is		7.637					M
9	15:0	0.28	8.148	-0.021	621	BB	2.5	
10	16:0 ante-is	0.05	9.040	-0.018	101	BB	2.8	
11	16:0	17.55	9.990	0.044	38679	BB	3.6	
12	16:1w9	0.47	10.339	0.146	1030	BV	2.9	
13	16:1w7	2.42	10.464	-0.032	5327	VV	0.0	
14		0.00	10.531	0.000	0	VB	2.7	
15		0.08	10.678	0.000	174	BB	2.6	
16	17:0 isobr.	0.11	10.880	-0.019	246	BV	3.3	
17		0.05	10.931	0.000	102	VV	2.9	
18		0.02	11.123	0.000	51	VV	3.1	
19		0.10	11.189	0.000	226	VV	3.0	
20		0.05	11.286	0.000	100	VB	2.8	
21	16:2w4- Fit.	0.23	11.586	-0.020	508	BV	5.1	
22	17:0	0.55	11.813	-0.009	1206	VB	2.8	
23	16:3w4	0.42	12.296	0.030	932	BB	3.2	
24		0.02	12.443	0.000	51	TS	0.0	
25	17:1	0.07	12.764	-0.008	155	BV	3.6	
26		0.05	12.880	0.000	112	VV	2.8	
27	16:3w3	0.04	13.030	-0.029	79	VV	2.8	
28		0.09	13.197	0.000	200	VV	3.2	
29	16:4w3	0.08	13.347	-0.026	185	VB	3.0	
30	18:0	7.75	13.813	0.040	17085	BB	3.6	
31		0.06	14.068	0.000	135	BV	3.5	
32	18:1w9	18.66	14.288	0.062	41134	VV	4.3	
33	18:1w7	2.34	14.379	0.021	5158	VB	2.6	
34		0.05	14.477	0.000	100	TS	0.0	
35	18:1w5	0.10	14.604	0.001	222	TS	0.0	
36	19:0 isobr		14.882					M
37	18:2w6	15.04	15.211	0.065	33156	BB	4.0	
38		0.08	15.388	0.000	180	BV	0.0	
39		0.00	15.446	-0.000	0	VB	3.2	
40	18:3w6	0.04	15.558	-0.004	82	BB	2.3	
41	19:0	0.22	15.788	-0.016	478	BB	3.7	
42	18:3w4	0.05	16.223	-0.024	107	BV	4.0	
43		0.06	16.323	0.000	134	VP	2.9	
44	18:3w3	0.85	16.550	-0.012	1873	FB	3.4	
45		0.08	17.029	0.000	184	BV	5.9	
46		0.25	17.228	0.000	549	VV	4.0	
47	18:4w3	0.50	17.311	-0.024	1106	VB	3.9	
48		0.15	17.651	0.000	328	BB	5.3	
49	20:0	0.18	18.147	0.025	386	BB	4.0	
50	20:1w11	0.41	18.631	0.005	899	BV	4.8	
51	20:1w9	1.89	18.762	0.011	4159	VP	4.2	
52	20:1w7	0.14	18.981	-0.000	315	FB	0.0	
53		0.05	19.640	0.000	100	BV	4.3	
54		0.46	19.896	0.000	1016	VB	4.7	
55	20:2w6	0.26	20.184	-0.003	572	BV	4.8	
56		0.05	20.389	0.000	110	VB	4.7	
57		0.32	20.754	0.000	706	BV	4.8	
58	21:0	0.23	21.105	-0.002	500	VB	5.3	
59	20:4w6	4.51	21.959	0.040	9948	BB	5.7	
60	20:3w3	0.07	22.434	0.003	150	BB	5.4	
61		0.05	22.851	0.000	110	BB	5.4	
62		1.05	23.281	0.000	2314	BV	6.0	
63	20:4w3	0.29	23.517	-0.006	646	VB	6.2	
64	20:5w3	2.55	24.514	-0.063	5610	BB	6.6	
65	22:0	0.12	24.961	0.006	235	BB	6.3	
66	22:1w11	1.94	25.713	-0.038	4279	BV	7.1	
67	22:1w9	0.43	25.958	0.022	952	VB	7.1	
68		1.65	27.627	0.000	3636	BB	8.1	
69	21:5w3	0.07	29.624	-0.013	164	BB	6.2	
70	23:0		30.050					M
71	22:4w6	0.29	31.310	0.129	631	BB	10.8	
72	22:5w6	2.09	32.251	0.118	4617	BB	13.2	
73	22:5w3	1.21	35.737	0.028	2669	BB	11.2	
74	24:0		36.664					M
75	22:6w3	7.84	38.013	0.073	17281	BB	13.6	
76	24 :1w9		39.500					M
77		1.52	40.492	0.000	3340	BB	13.8	
Totals:		100.01		0.488	220384			

Anexo XVI: Cromatograma do bioacessível da corvina grelhada e respetivo relatório.



Print Date: Fri Sep 07 15:44:58 2012

Page 1 of 2

Title : LabLípidos - Área Laboratorial de Nutrição - DITVFF - IFIMAR
 Run File : c:\star\data\sara costa\tlcs\bioacessível\bioac. corvina grel p3.run
 Method File : bioac. corvina grel p3-front.mth
 Sample ID : corvina grel bio p3

Injection Date: 17-08-2012 16:45 Calculation Date: 07-09-2012 15:44

Operator : julia Detector Type: 3800 (1 Volt)
 Workstation: GC-3800 Bus Address : 44
 Instrument : GC-3800 Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : Front = FID Run Time : 41.958 min

** GC Workstation Version 6.20 ** 03133-3790-826-0675 **

Run Mode : Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent

Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		0.01	3.114	0.000	111	BB	1.7	
2	11:0	0.03	4.306	0.003	245	BB	1.9	
3	12:0		4.781					
4	13:0	0.01	5.309	-0.016	105	BB	2.3	M
5	14:0 isobr		5.943					
6	14:0	2.26	6.636	0.022	18618	BB	2.6	M
7		0.02	7.036	0.000	129	BB	2.6	
8		0.02	7.221	0.000	158	BB	2.5	
9	15:0 isobr	0.09	7.401	0.016	767	BB	2.7	
10	15:0 ante-is	0.03	7.653	0.016	257	BV	2.7	
11		0.02	7.773	0.000	131	VB	2.4	
12	15:0	0.41	8.193	0.024	3370	BB	2.8	
13	16:0 ante-is	0.07	9.087	0.029	544	BB	3.8	
14		0.01	9.333	0.000	114	BB	4.8	
15	16:0		9.946					
16	16:1w9	20.89	10.143	-0.050	172480	BP	7.0	M
17		0.04	10.287	0.000	310	TS	0.0	
18	16:1w7	0.48	10.422	-0.075	4000	EV	0.0	
19		3.66	10.574	0.000	30238	VB	3.3	
20		0.12	10.745	0.000	980	BP	2.6	
21	17:0 isobr.	0.03	10.944	0.043	1858	PV	2.6	
22		0.04	11.178	0.000	313	VV	2.6	
23		0.12	11.248	0.000	985	VB	2.8	
24	16:2w4- Fit.	0.37	11.641	0.035	3051	BV	4.8	
25	17:0	0.60	11.877	0.000	4914	VB	2.9	
26	16:3w4	0.14	12.000	0.034	1166	BP	3.8	
27		0.36	12.355	0.000	2961	VB	3.7	
28		0.04	12.501	0.000	309	TS	4.0	
29	17:1	0.10	12.828	0.056	828	EV	4.0	
30		0.04	12.934	0.000	343	VP	3.2	
31	16:3w3	0.03	13.088	0.029	271	BP	3.2	
32	16:4w3	0.13	13.402	0.029	1039	BB	3.1	
33	18:0	7.41	13.768	0.163	61150	BV	7.5	
34	18:1w9		14.236					
35	18:1w7	19.31	14.462	0.104	159436	VV	7.4	M
36		0.57	14.572	0.000	21176	VB	2.7	
37	18:1w5	0.02	14.590	-0.013	163	TS	0.0	
38		0.13	14.698	0.000	1073	TS	0.0	
39	19:0 isobr	0.03	14.971	0.089	262	BB	3.5	
40	18:2w6		15.146					
41		13.31	15.365	0.000	109848	BB	6.1	M
42	18:3w6	0.06	15.487	-0.075	457	TS	0.0	
43		0.07	15.650	0.000	567	BB	2.1	
44	19:0	0.22	15.685	0.000	1830	BB	4.1	
45		0.02	16.184	0.000	187	BP	3.8	
46	18:3w4	0.07	16.307	0.059	617	VV	4.7	
47		0.03	16.407	0.000	260	VB	4.0	
48	18:3w3	1.08	16.449	0.087	8924	BB	3.6	
49	18:4w3	0.79	17.405	0.070	6508	BB	3.7	
50		0.15	17.727	0.000	1216	BB	6.6	
51	20:0	0.24	18.248	0.126	1992	BB	4.2	
52	20:1w11		18.626					
53		0.42	18.746	-0.005	3450	BV	6.1	M
54	20:1w9	2.63	18.920	-0.061	21706	VP	5.2	
55	20:1w7	0.18	19.095	0.000	1465	BP	0.0	
56		0.06	19.739	0.000	531	BV	4.4	
57		0.02	19.937	0.000	2201	VB	4.5	
58	20:2w6	0.07	20.029	0.108	2226	BV	4.8	
59		0.03	20.295	0.000	246	VB	4.7	
60		0.18	20.862	0.000	1446	BB	5.2	
61	21:0	0.18	21.216	0.109	1497	BB	5.6	
62	20:4w6	2.84	22.117	0.198	23434	BB	6.4	
63	20:3w3	0.09	22.159	0.128	772	BB	5.5	
64	20:4w3	0.42	23.663	0.140	3439	BB	6.2	
65	20:5w3	3.61	24.750	0.174	29839	BB	7.8	
66	22:0	0.14	25.127	0.172	1196	TS	0.0	
67	22:1w11		25.675					
68	22:1w9	2.65	25.984	0.048	21913	BV	9.1	M
69		0.50	26.176	0.000	4155	VV	6.5	
70		0.08	26.540	0.000	641	VB	7.4	
71	21:5w3	0.13	29.812	0.175	1041	BP	6.9	

72	23:0	0.03	30.094	0.044	262	PB	0.0	
73	22:4w6	0.23	31.514	0.333	1894	BB	10.9	
74	22:5w6	0.30	33.341	0.208	2500	BB	9.5	
75	22:5w3	1.26	36.039	0.330	10365	BV	11.8	
76	24:0	0.14	36.757	0.093	1118	VB	12.5	
77	22:6w3	7.74	38.536	0.596	63928	BB	19.9	
78	24 :1w9		39.500					M

----- Totals: 100.01 3.721 825526 -----

Anexo XVII: Ajuste dos teores de gordura nas amostras de bioacessível da corvina.

A. Massa de gordura na solução de enzimas.

	Vol. Bioacessível (mL)	m gordura (g)	m bioacessível (g)	m gordura (usando o peso) (g)*
Branco (sol. Enzimas)	22	0,0135	25,55	0,0157

*A massa de gordura presente no branco foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Massa de gordura (g)} = \frac{\text{massa bioacessível (g)} \times \text{massa gordura (g)}}{\text{Vol. bioacessível (mL)}}$$

B. Percentagem de gordura nas amostras.

	Vol. Bioac. usado na extração (ml)	m gordura (g)	m gordura corrigida (g)	% Gordura no vol. Extraído	m bioac. (g)	m gordura no bioacessível total corrigida (g)
Corvina crua	11,3	0,015	0,0076	0,07	26,95	0,018
Corvina grelhada	9,8	0,012	0,0063	0,06	27,15	0,017

- Massa de gordura corrigida (g) =**

$$\frac{\text{massa gordura (g)} - (\text{Vol. bioac usado na extração} \times \text{massa gordura do branco})}{\text{Vol. bioac. branco}}$$

- % gordura extraída =** $\frac{\text{massa gordura corrigida (g)}}{\text{Vol. Bioac (mL)}} \times 100.$

- Massa gordura corrigida no bioacessível (g) =** $\frac{\text{massa bioacessível (g)} \times \text{massa corrigida (g)}}{\text{Vol. bioacessível (mL)}}.$

Anexo XVIII: Cálculos para obtenção da composição em ácidos gordos dos bioacessíveis da corvina, em valores absolutos.

A. Determinação do fator de conversão do bioacessível da corvina crua e grelhada.

	FFA	CL	DAG	MAG	PL	
%	61	21	15	2	2	% retiradas da TLC analítica.
Factor	1,0	0,0	0,907	0,782	0,7	Fatores tabelados.
Factor inicial			0,772			Fator calculado.

		Massa molecular	Massa ajustada Inicial
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	89,0539

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmitico (C16:0)	C16H32O2	256,420	22,85	0,31	239,413	73,877
Oléico (C18:1)	C18H34O2	282,461	26,29	0,36	265,455	94,244
Linoleico (C18:2w6)	C18H32O2	280,000	17,7	0,24	262,993	62,863
Esterárico (C18:0)	C18H36O2	284,477	7,21	0,10	267,470	26,043
Hexadecatienoico (16:3w3)	C16H26O2	250,38	0	0,00	233,373	0,000
			74,05			257,027
						860,134
						822,1008

		Massa ajustada	
		Massa molecular	DAG+CL
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	90,0618

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmitico (C16:0)	C16H32O2	256,420	12,45	0,21	239,413	50,460
Oléico (C18:1)	C18H34O2	282,461	27,26	0,46	265,455	122,504
Linoleico (C18:2w6)	C18H32O2	280,000	3,4	0,06	262,993	15,138
Esterárico (C18:0)	C18H36O2	284,477	7,44	0,13	267,470	33,688
Hexadecatrienoi co (16:3w3)	C16H26O2	250,38	8,52	0,14	233,373	33,661
			59,07			255,451
						600,963
						544,9154

		Massa ajustada	
		Massa molecular	MAG
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,078	91,0697

		Massa molecular	% Cromatograma	Proporção entre os vários ácidos gordos	Peso molecular do ácido gordo quando está ligado ao glicerol	
Palmitico (C16:0)	C16H32O2	256,420	30,77	0,50	239,413	120,707
Oléico (C18:1)	C18H34O2	282,461	8,8	0,14	265,455	38,276
Linoleico (C18:2w6)	C18H32O2	280,000	5,12	0,08	262,993	22,063
Esterárico (C18:0)	C18H36O2	284,477	8,39	0,14	267,470	36,770
Hexadecatrienoi co (16:3w3)	C16H26O2	250,38	7,95	0,13	233,373	30,400
			61,03			248,217
						339,286
						265,2235

O esquema de cálculo é, exatamente, igual ao utilizado para o salmão.

B. Tabelas com todos os cálculos para obtenção dos ácidos gordos em valor absoluto.

Factor corretivo
%gordura

0,772

0,07

Factor corretivo
%gordura

0,772

0,06

Bioacessível Corvina crua					Bioacessível Corvina grelhada				
	% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g	mg/ 100 g		% Cromatograma	mg/100g c/fator	mg/ 1,5 g	mg/100 g
Saturados	27,69	14,96	4,19	279,32	Saturados	32,80	15,19	4,25	283,60
$\Sigma 14:0$	1,24	0,67	0,19	12,51	$\Sigma 14:0$	2,26	1,05	0,29	19,54
$\Sigma 16:0$	17,60	9,51	2,66	177,54	$\Sigma 16:0$	20,89	9,68	2,71	180,62
$\Sigma 18:0$	7,75	4,19	1,17	78,18	$\Sigma 18:0$	7,41	3,43	0,96	64,07
Monoinsaturados	26,29	14,21	3,98	265,20	Monoinsaturados	32,14	14,89	4,17	277,90
$\Sigma 16:1$	2,42	1,31	0,37	24,41	$\Sigma 16:1$	3,66	1,70	0,47	31,65
$\Sigma 18:1$	21,00	11,35	3,18	211,84	$\Sigma 18:1$	21,90	10,14	2,84	189,36
Polinsaturados	37,16	20,08	5,62	374,85	Polinsaturados	33,10	15,33	4,29	286,20
18:2 ω 6	15,04	8,13	2,28	151,72	18:2 ω 6	13,31	6,17	1,73	115,08
20:5 ω 3	2,55	1,38	0,39	25,72	20:5 ω 3	3,61	1,67	0,47	31,21
22:6 ω 3	7,84	4,24	1,19	79,09	22:6 ω 3	7,74	3,59	1,00	66,92
EPA+DHA	10,39	5,61	1,57	104,81	EPA+DHA	11,35	5,26	1,47	98,14
$\Sigma \text{Ómega } 3$	14,09	7,61	2,13	142,13	$\Sigma \text{Ómega } 3$	15,28	7,08	1,98	132,12
$\Sigma \text{Ómega } 6$	22,10	11,94	3,34	222,93	$\Sigma \text{Ómega } 6$	17,02	7,88	2,21	147,16
$\omega 3/\omega 6$	0,64	0,64	0,64	42,504	$\omega 3/\omega 6$	0,90	0,90	0,90	59,851
Total	91,14	49,25	13,79	919,37	Total	98,01	45,40	12,71	847,43